



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین
Qazvin University of Medical Sciences

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد (MSc) رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی اثر پاروویروس B19 بر بیان ژن های سایتوکاین های التهابی IL-6، IL-1 β ،

TNF- α و ژن NF- κ B در سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط

آزمایشگاهی

استاد راهنما: دکتر نعمت ا... غیبی

استادان مشاور:

دکتر امیر آتشی - دکتر مهدی آزاد

نگارنده: شاهین امیری

تقدیم با بوسه بر دستان

مادر و پدر عزیزتر از جانم

که بعد از خداوند هر چه دارم از وجود مقدس و حمایت‌های ایشان است.

سپاسگزاری:

خداوند را سپاس می‌گویم که مرا به زیور پیوسته آموختن مزین کرد و سپاسی ویژه از بزرگوارانی دارم که در این مسیر با انتقال معلومات و تجربیات ارزشمند خود مرا رهنمون بودند. از مریبان مهربانم در دوران خردسالی، دبستان، راهنمایی و دبیرستان تا استادان عزیزم در دانشگاه؛

و اینک تشکری مضاعف دارم از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر نعمت‌ا... غیبی و استادان مشاور گرانقدرم جنابان آقایان دکتر مهدی آزاد و دکتر امیر آتشی که نه تنها در انجام این پایان‌نامه و تکمیل این مهم از هیچ کوشش و محبتی نسبت به بنده دریغ نفرمودند بلکه در کنار علم، از ایشان درس زندگی و انسانیت آموختم.

از خالق بی‌همتا همواره برایشان سلامتی، توفیق و پیوسته یاددادن مسئلت دارم.

چکیده:

زمینه: التهاب مزمن چنان که از شواهد علمی متعدد برمی آید، نقش بسیار مهمی در شکل گیری و توسعه سرطان بازی می کند. از سوی دیگر، التهاب، می تواند توسط فاکتورهای مختلفی از جمله عفونت های ویروسی ایجاد گردد. پاروویروس B19 (B19V) یک پاتوژن با عفونت شایع است که سلول های پیش ساز اریتروئیدی مغز استخوان را آلوده می سازد. نشان داده شده است که B19V می تواند وارد سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی (hBM-MSCs) شده و به صورت نهفته باقی بماند. در این مطالعه، فرض ما بر این استوار بوده است که امکان آن وجود دارد hBM-MSCها به عنوان یکی از اجزای اصلی آشیانه مغز استخوان پس از آلوده شدن با B19V سائتوکاین های پیش التهابی ترشح کنند.

مواد و روش ها: جهت ارزیابی فرضیه، hBM-MSCها در محیط کشت استاندارد تا پاساژ سوم، کشت داده شدند و با پلاسمید حاوی ژنوم پاروویروس B19 توسط نوکلئوفکشن آلوده سازی گشتند. بعد از ۳۶ ساعت RNA تام از تمام گروه های مورد مطالعه استخراج و ارزیابی کمی بیان ژن های $\text{IL-1}\beta$ ، IL-6 ، $\text{TNF-}\alpha$ و $\text{NF-}\kappa\text{B}$ توسط ریل تایم پی سی آر انجام شد.

یافته ها: تجزیه و تحلیل داده های به دست آمده افزایش معناداری را در بیان هر چهار ژن مورد مطالعه ($\text{TNF-}\alpha$ ، $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ، IL-6 ، $\text{IL-1}\beta$) در سلول های آلوده به ویروس B19 نشان داد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: تا به امروز تحقیقات متعددی بقای B19V را در بافت های مختلف، خصوصاً مغز استخوان به اثبات رساندند. اگرچه مطالعات بیشتر در این زمینه نیاز است؛ یافته های ما برای اولین بار اهمیت عفونت hBM-MSCها را با پاروویروس B19 از حیث ایجاد یک محیط التهابی در مغز استخوان و متعاقباً ارتباط آن را با بیماری های ارگان های خون ساز مرتبط با التهاب نشان می دهد. در نهایت بر اساس نتایج به دست آمده، سنجش های ملکولی برای تشخیص عفونت hBM-MSCها با پاروویروس B19 قبل از سلول درمانی به طور مؤکد، سفارش می گردد.

کلمات کلیدی: التهاب مزمن، پاروویروس B19، سلول های بنیادی مزانشیمی، عفونت، مغز استخوان

فهرست اختصارات:

A

ABI: applied biosystems inc.

AAV: adeno-associated virus

AML: acute myeloma leukemia

ASC: adult stem cell

ATPase: adenosine triphosphatase

B

B19V: b19 virus

Bcl: b-cell lymphoma

BFU: burst forming unit

BLAST: basic local alignment search tool

BM-MSC: bone marrow-derived mesenchymal stem cell

BMSC: bone marrow stromal cell

BM-SSC: bone marrow derived stromal stem cell

C

CD: cluster of differentiation

cFLIP: cellular fllice-like inhibitory protein

CFU: colony forming unit

CXCR4: c-x-c chemokine receptor type 4

D

DMEM: dulbecco's modified eagle's medium

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

F

EBV: epstein-barr virus

EDTA: ethylene diamine tetra acetic acid

EGF: endothelial growth factor

FBS: fetal bovine serum

FGF: fibroblast growth factor

FITC: fluorescein isothiocyanate

G

GFP: green fluorescent protein

GVHD: graft versus host disease

H

hBM-MSC: human bone marrow-derived mesenchymal stem cell

HBV: hepatitis b virus

HCC: hepatocellular carcinoma

HCV: hepatitis c virus

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

HHV-8: human herpes virus type 8

HIV: human immunodeficiency virus

HLA-DR: human leukocyte antigen – antigen d related

HPV: human papillomavirus

HSC: hematopoietic stem cell

HTLV-1: human t-cell leukemia virus type 1

I

ICM: inner cell mass

IgG: immunoglobulin g

IgM: immunoglobulin m

IL-1RN: interleukin-1 receptor antagonist

IL-1 β : interleukin-1 β

IL-6: interleukin-6

ISCT: international society of cell therapy

ITR: internal tandem repeat

J

JAK/STAT: janus kinase/signal transducer and activator of transcription

L

LB: luria broth

LB: luria-bertani

LTR: long terminal repeat

M

MEM: eagle's minimum essential medium

MHC: major histocompatibility complex

MPC: mesenchymal progenitor cell

mRNA: messenger ribonucleic acid

MSC: mesenchymal stem cell

MV: microvesicle

MVM: minute virus of mice

N

NCBI: national center for biotechnology information

NF- κ B: nuclear factor-kappa b

NS1: nonstructural protein 1

P

PARP: poly adp ribose polymerase

PBS: phosphate-buffered saline

PCNA: proliferating cell nuclear antigen

PRCA: pure red cell aplasia

PTEN: phosphatase and tensin homolog

PVB19: parvovirus b19

R

RNA: ribonucleic acid

RNase: ribonuclease

ROS: reactive oxygen species

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction

S

SP1: signal protein 1

SP3: signal protein 3

T

TGF- β : transforming growth factor-beta

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

V

VP1: viral protein 1

VP2: viral protein 2

فهرست

| | |
|---|----|
| چکیده: | ج |
| زمینه: | ج |
| مواد و روش‌ها: | ج |
| یافته‌ها: | ج |
| بحث و نتیجه‌گیری: | ج |
| کلمات کلیدی: | ج |
| فهرست | ر |
| فهرست جداول | ص |
| فهرست شکل‌ها و نمودارها | ض |
| فصل اول | ۱ |
| بیان مسئله | ۲ |
| ۱-۱ کلیات | ۲ |
| ۱-۱-۱ سرطان و التهاب مزمن | ۲ |
| ۲-۱-۱ مکانیسم ملکولی | ۳ |
| ۳-۱-۱ عوامل میکروبی، التهاب و تومورزایی | ۷ |
| ۱-۲ پاروویروس B19: | ۱۱ |

| | | |
|--------|--|----|
| ۱-۲-۱ | معرفی و تاریخچه: | ۱۱ |
| ۳-۲-۱ | تاکسونومی: | ۱۲ |
| ۴-۲-۱ | اپیدمیولوژی و تنوع ژنتیکی: | ۱۴ |
| ۵-۲-۱ | ژنوم پاروویروس: | ۱۷ |
| ۶-۲-۱ | تکثیر ژنوم ویروس: | ۱۹ |
| ۷-۲-۱ | پروتئین‌های پاروویروس B19 | ۲۲ |
| ۸-۲-۱ | گرایش پاروویروس B19 | ۲۷ |
| ۹-۲-۱ | عفونت مداوم پاروویروس B19 | ۲۹ |
| ۱۰-۲-۱ | جنبه‌های کلینیکی و پاتوژنتیک عفونت پاروویروس B19 | ۳۱ |
| ۱۱-۲-۱ | تشخیص B19 | ۳۲ |
| ۳-۱ | سلول بنیادی مزانشیمی | ۳۵ |
| ۱-۳-۱ | تاریخچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۳۵ |
| ۳-۳-۱ | معرفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۳۸ |
| ۴-۳-۱ | مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۴۰ |
| ۵-۳-۱ | منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۴۰ |
| ۶-۳-۱ | مارکرهای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۴۱ |
| ۷-۳-۱ | محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۴۳ |
| ۸-۳-۱ | کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی | ۴۴ |

| | |
|--|----|
| ۴-۱ اهداف تحقيق: | ۴۶ |
| ۴-۱-۱ هدف اصلي اين تحقيق: | ۴۶ |
| ۴-۱-۲ اهداف فرعي اين مطالعه: | ۴۶ |
| ۴-۱-۳ اهداف کاربردي اين مطالعه: | ۴۶ |
| ۱-۵ فرضيه‌ها سؤال‌هاي پژوهش: | ۴۶ |
| فصل دوم | ۴۷ |
| ۲-۱ مروري بر مطالعات انجام شده در ارتباط سرطان و التهاب مزمن: | ۴۸ |
| ۲-۱-۱ مروري بر مطالعات انجام شده بر روي ارتباط آلودگي‌هاي ميكروبي با التهاب و سرطان: | ۵۰ |
| ۲-۱-۲ مروري بر مطالعات انجام شده در ارتباط با عفونت پاروويروس B19: | ۵۲ |
| فصل سوم | ۵۶ |
| ۳-۱ مواد و وسايل | ۵۷ |
| ۳-۱-۱ مواد: | ۵۷ |
| ۳-۱-۲ وسايل آزمايشگاهي مورد نياز | ۵۶ |
| ۲-۳ روش‌ها | ۵۹ |
| ۱-۲-۳ روش تهيه بافرها و معرف‌ها | ۵۹ |
| ۲-۲-۳ محيط كشت‌هاي مورد استفاده | ۶۱ |
| ۳-۳ مراحل انجام پژوهش | ۶۲ |

| | | |
|-------|--|-----|
| ۳-۳-۱ | جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و تأیید آن‌ها | ۶۳ |
| ۳-۳-۲ | تمایز سلول‌های تک هسته‌ای به سلول‌های استئوبلاست و تأیید تمایز | ۶۵ |
| ۳-۳-۳ | تکثیر پلاسمید | ۶۹ |
| ۳-۳-۴ | استخراج RNA | ۷۶ |
| ۳-۳-۵ | سنتز cDNA | ۷۷ |
| ۳-۳-۶ | آزمایش Real-time PCR | ۸۲ |
| ۳-۳-۶ | اقدامات بیوانفورماتیک | ۸۳ |
| | فصل چهارم | ۸۵ |
| ۴-۱ | نتایج و یافته‌ها: | ۸۶ |
| ۴-۱-۱ | تأیید سلول‌های مزانشیمی | ۸۶ |
| | فصل ۵ | ۱۰۴ |
| ۵-۱ | بحث | ۱۰۵ |
| ۵-۲ | نتیجه‌گیری | ۱۱۳ |
| ۵-۳ | پیشنهادهای | ۱۱۳ |
| | فهرست منابع | ۱۱۴ |

فهرست جداول

| | |
|---|----|
| جدول ۱-۱: رده‌بندی خانواده پاروویریده و میزبان هر گونه به طور مجزا..... | ۱۳ |
| جدول ۱-۳ لیست مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق..... | ۷۹ |
| جدول ۲-۳. مواد و مقادیر واکنشی quantitative Real Time-PCR..... | ۸۲ |
| جدول ۳-۳. برنامه دمایی quantitative Real Time-PCR..... | ۸۲ |

فهرست شکل ها و نمودارها

- شکل ۱-۱ تصویری شماتیک از نقش انواع سایتوکاین های در سرطان زایی..... ۶
- شکل ۲-۱ تصویری شماتیکی از مسیر شروع یک التهاب توسط عوامل مختلف و نهایتاً تبدیل این سیگنال به تومورزایی و توسعه آن..... ۱۰
- شکل ۳-۱ ساختار ژنومی پاروویروس B19 انسانی و نقشه ژنتیکی آن..... ۱۹
- شکل ۴-۱ تصویری شماتیک از B19V، کپسید و پروتئین های NS-1، VP1 و VP2..... ۲۳
- شکل ۵-۱. A. عدم ورود B19V به گلبول های قرمز بالغ با وجود بیان آنتی ژن P ۲۸
(گلوبوساید). B. ورود B19V به داخل سلول های پیش ساز اریتروئیدی به دلیل وجود اینتگرین در کنار آنتی ژن P (گلوبوساید).....
- شکل ۶-۱. A. بیماری پنجم یا آریتم عفونی B. بحران آپلازی C. بیماری ادم جنین (hydrops fetalis)..... ۳۰
- شکل ۷-۱. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs)..... ۳۷
- شکل ۸-۱. تصویری میکروسکوپ نوری از کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی..... ۴۰
- شکل ۹-۱. کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی..... ۴۴
- شکل ۲-۱ بیماران تحت درمان پیوند سلول های بنیادی که MSC های آلوده به B19V را جهت درمان GVHD دریافت کردند..... ۵۳

- شکل ۳-۱. مراحل انجام پژوهش به صورت خلاصه..... ۶۲
- شکل ۳-۲. سلول‌ها، در پلیت ۲۴ خانه و در انکوباتور تحت شرایط استاندارد قرار گرفتند. ۷۴
- شکل ۳-۳ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن IL-1 β ۷۹
- شکل ۳-۴ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن IL-6 ۸۰
- شکل ۳-۵ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن TNF- α ۸۰
- شکل ۳-۶ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن NF- κ B ۸۱
- شکل ۴-۱ سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی در زیر میکروسکوپ نوری ۸۶
- شکل ۴-۲ هیستوگرام فلوسایتومتری ۴ CD مارکر سطح سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جهت تأیید هویت این سلول‌ها ۸۸
- شکل ۴-۳. الف - رنگ‌آمیزی سلول‌های تک‌هسته‌ای با Alizarin-Red ب - ۸۹
رنگ‌آمیزی سلول‌های تک‌هسته‌ای با Oil-Red (۹ روز پس از رشد در محیط‌های القای استئوبلاستی و ادیپوسایتی
- شکل ۴-۴ وکتور pHI0 که حاوی ژنوم پاروویروس B19 می‌باشد..... ۹۰
- شکل ۴-۵ الکتروفورز پلاسمید pHI0 تکثیر یافته در باکتری DH5 α ۹۱
- شکل ۴-۶ تصویر سلول‌های آلوده شده با گزارشگر GFP، حاصل از میکروسکوپ فلورسنت..... ۹۲
- شکل ۴-۷ عکس ژل الکتروفورز بیان ژن NS1 و پروتئین‌های کپسید پاروویروس ۹۳

| | | |
|-------|---|--|
| | B19 در داخل hBM-MSc ها | |
| ۹۴ | شکل ۸-۴ نتایج حاصل از RT-PCR قیل از انجام qPCR برای سنجش صحت فعالیت پرایمرهای طراحی شده و همچنین تعیین دمای مناسب اتصال پرایمرها..... | |
| ۹۵ | نمودار ۱-۴ نمودار تغییرات بیان ژن IL-1 β | |
| ۹۶ | نمودار ۲-۴ نمودار تغییرات بیان ژن IL-6..... | |
| ۹۷ | نمودار ۳-۴ نمودار تغییرات بیان ژن NF- κ B..... | |
| ۹۸ | نمودار ۴-۴ نمودار تغییرات بیان ژن TNF- α | |
| ۹۹ | شکل ۸-۴ نتایج دمای ذوب برای ژن IL-1 β | |
| ۹۹ | شکل ۹-۴ نتایج دمای ذوب برای ژن IL-6..... | |
| ۱۰۰ | شکل ۱۰-۴ نتایج دمای ذوب برای ژن TNF- α | |
| ۱۰۰ | شکل ۱۱-۴ نتایج دمای ذوب برای ژن NF- κ B..... | |
| ۱۰۱ | شکل ۱۲-۴. نتایج دمای ذوب برای ژن β -Actin..... | |

فصل ۱

مقدمه و اهمیت موضوع

بیان مسئله

۱-۱ کلیات

۱-۱-۱ سرطان و التهاب مزمن:

التهاب، به خودی خود پاسخ مفیدی است که در پی یک جراحت و یا ورود عوامل عفونی به بدن ایجاد می‌گردد؛ اما چنانچه این پاسخ از تنظیم خارج شود تبدیل به التهاب مزمن شده که این رخداد می‌تواند باعث ایجاد سلول‌های توموری در اطراف بافت مورد نظر گردد.

نقش التهاب مزمن در شکل‌گیری و گسترش سرطان، اولین بار در سال ۱۸۶۳ میلادی توسط آقای رودالف ویرچاو^۱ مطرح شد. مشاهدات وی از نفوذ سلول‌های التهابی (لوکوسیت‌ها) به بافت توموری سبب شد چنین فرضیه‌ای مبنی بر ارتباط سرطان و التهاب مزمن مطرح گردد. پس از آن و به خصوص در یک دهه اخیر فرضیه آقای ویرچاو توسط مطالعات بسیار زیادی تأیید و مشخص شده است که عامل شکل‌گیری سرطان‌های متعددی در جمعیت انسانی، عفونت^۲ و متعاقباً التهاب مزمن می‌باشد؛ و در حقیقت این نوع التهاب نقش بسیار مهمی در تمامی مراحل سرطان از شکل‌گیری تا متاستاز بازی می‌کند (۱).

از لحاظ همه‌گیرشناسی^۳، عامل حداقل ۲۰٪ از تمام سرطان‌های انسانی، عفونت‌های پایدار^۴ و نتیجتاً التهاب مزمن است؛ و آن دسته از سرطان‌هایی هم که به طور مستقیم برآمده از التهاب

^۱ Rudolf virchow

^۲ Infection

^۳ Epidemiology

^۴ Persistent infections

مزمن نیستند، نشان از نفوذ بسیار زیاد سلول‌های التهابی به تومور و در واقع آنچه که تومور برخاسته از التهاب^۵ می‌نامیم، همراه با بیان بالای سایتوکاین‌های التهابی دارند (۲).

۱-۲ مکانیسم ملکولی:

پاسخ ایمنی به التهاب، در پی تشخیص عامل بیماری‌زا یا آسیب بافتی، موجب رخداد یک سری از وقایع می‌گردد. این پاسخ ایمنی، شامل سلول‌های ایمنی (مانند ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک، نوتروفیل‌ها، ائوزینوفیل‌ها، ماست سل‌ها، NK سل‌ها^۶) و میانجی‌های محلول (مانند سایتوکاین‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی) است. هدف اصلی این پاسخ‌های ایمنی حذف عوامل خارجی ایجاد کننده هومئوستاز^۷ بافتی‌ست. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، به صورت نرمال، پس از دفع عوامل خارجی، التهاب، برطرف شده و مشکل هومئوستاز بافتی نیز مرتفع خواهد شد اما در غیر این صورت، التهاب مزمن ایجاد خواهد شد؛ و این موضوع نیز کاملاً پذیرفته شده که التهاب مزمن ریسک بزرگی برای ایجاد سرطان خواهد بود (۳).

سایتوکاین‌ها پروتئین‌هایی با وزن ملکولی بالا هستند که ارتباطات بین سلولی را واسطه‌گری می‌کنند. بر اساس نوع ریزمحیط تومور، سایتوکاین‌ها می‌توانند فعالیت ضد توموری داشته باشند اما چنانچه التهاب مزمن ایجاد گردد، این ملکول‌ها می‌توانند موجب القای دگرگونی سلولی و بدخیمی، تغییر در توازن بین سایتوکاین‌های تومورزا و ضدتوموری و بسیاری دگرگونی‌های دیگر گردند.

^۵ Tumor-elicited inflammation

^۶ Natural killer cells

^۷ Homeostasis

فاکتور نکروز تومور^۸ آلفا ($\text{TNF-}\alpha$)، از آن دسته واسطه‌های التهابی است که به سبب حضور در بیماری‌های ناشی از التهاب مزمن، به عنوان یک ملکول سرطان‌زا^۹ شناخته می‌شود. به نظر می‌رسد تأثیر $\text{TNF-}\alpha$ در مراحل آغازین سرطان، مانند رگرایی و تهاجم تومور، بسیار مهم بوده و تأثیر کمتری در مرحله گسترش سرطان دارد. البته این نکته قابل ذکر است که بحث بر سر غلظت و حتی جایگاه بیان $\text{TNF-}\alpha$ و تأثیر ضدتوموری و یا تومورزایی آن گسترده است و به طور خلاصه، تحقیقات نشان می‌دهند که غلظت‌های بالای این ملکول می‌تواند فعالیت ضد توموری داشته و به عکس، غلظت کم آن، تومورزایی را القا خواهد نمود (۳).

اینتروکین ۶ (IL-6)، سایتوکاین پیش التهابی دیگری است که به طور معمول، اثر پیش‌تومورزایی دارد. سطح سرمی بالایی از این ملکول در بیماران مبتلا به سرطان سیستمیک در مقایسه با افراد سالم و یا دارای بیماری‌های خوشخیم، مهر تأییدی بر این موضوع است. IL-6 یک پیش‌آگهی برای سرطان بدخیم با حساسیت ۶۰ تا ۷۰ درصد و اختصاصیت ۵۰ تا ۹۰ درصد است؛ با این وجود مطالعات اندکی در این خصوص و در حقیقت، استفاده از این شاخص به عنوان یک ابزار تشخیصی صورت گرفته است. IL-6 با اتصال به گیرنده‌های خود و راه‌اندازی سیستم پیام‌رسانی JAK/STAT نقش بسزایی در افزایش تقسیم سلولی و جلوگیری از آپوپتوز بازی می‌کند (۳، ۴).

اینتروکین ۱ بتا ($\text{IL-1}\beta$)، سایتوکاین پیش التهابی دیگری است با اثرات چندگانه که افزایش بیان آن ارتباط بسیار تنگاتنگی با سرطان‌های مختلف از جمله تومورهای دستگاه گوارش و پروستات دارد (۵، ۶). نشان داده شده است که این سایتوکاین، در روند سرطان باعث بیان

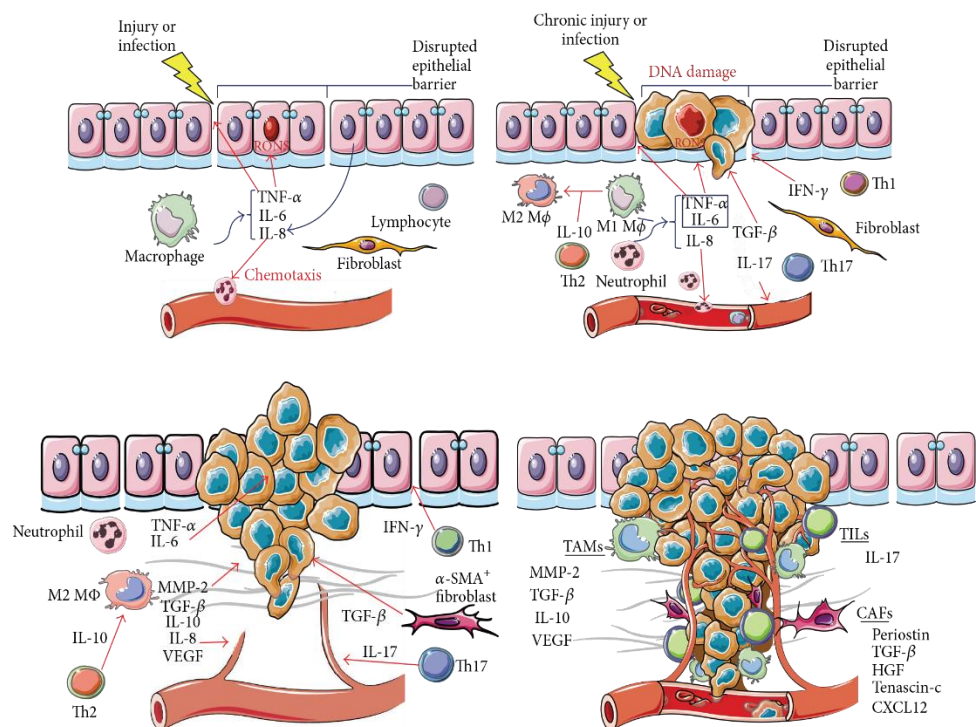
^۸ Tumor necrosis factor

^۹ Carcinogenesis

مارک‌هایی می‌شود که سلول سرطانی را تبدیل به سلول بنیادی سرطانی کرده و به آن خاصیت خودنوسازی می‌دهد. همچنین IL-6 باعث افزایش خاصیت تهاجمی سلول‌های توموری در سرطان روده بزرگ می‌گردد. همچنین پلی‌مورفیسم‌های مختلف این سایتوکاین و همچنین IL-1RN در سفیدپوستان، با ریسک سرطان معده در ارتباطی نزدیک است (۷).

فاکتور هسته‌ای κB (NF- κB)، این فاکتور رونویسی، اولین بار در پروسه اتصال به المان‌های κB بر روی افزاینده‌های γ ژن زنجیره سبک ایمونوگلوبولین کاپا در B-Cell‌ها کشف شد (۸). NF- κB از جمله خانواده فاکتورهای رونویسی است که در هماهنگی و هم‌نوایی التهاب نقشی به شدت اساسی دارد. در اکثر سرطان‌ها این فاکتور، دائماً فعال بوده و نقش خود را در سرطان‌زایی از طرق مختلف ایفا می‌کند. همچنین در ایجاد التهاب مزمن و در نتیجه گسترش تومور بازیگر صحنه است. متوقف کردن این پروتئین برای درمان سرطان از لحاظ تئوری عملی است اما به دلیل پیچیدگی بسیار زیاد مسیرهای آن، اقدامات درمانی گاهی به ایجاد سمیت برای سلول منجر می‌گردد (۹).

شکل ۱-۱، تصویر شماتیکی از نقش انواع سایتوکاین‌های در ریزمحیط تومور و سرطان‌زایی را نشان می‌دهد (۳).



شکل ۱-۱، تصویری شماتیک از نقش انواع سایتوکاین‌های در سرطان‌زایی

یکی از نمونه‌های ارتباط التهاب و تومور، در سلول‌های اپیتلیالی روده بزرگ به اثبات رسیده است. $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ، TNF را در سلول مایلوئید (Myeloid) فعال می‌کند و باعث ایجاد التهاب توموری می‌گردد. IL-23 (اینترلوکین ۲۳)، به لنفوسیت‌های T علامت می‌دهد تا تولید IL-17 و IL-22 را شروع کنند. TNF ، IL-6 ، IL-17 ، IL-21 و IL-22 ، باعث فعال‌شدن سیگنال $\text{NF-}\kappa\text{B}$ و STAT3 در سلول‌های ترنسفورمه‌شده (توموری) اپیتلیالی روده بزرگ شده و موجبات بقا و تکثیر آن‌ها را فراهم می‌گردند. از سوی دیگر IL-10 و $\text{TGF-}\beta$ از طریق کاهش و بهبود التهاب، گسترش سرطان روده‌ی بزرگ را محدود کرده و از آن جلوگیری می‌کنند (۱۰).

مسیرهای پیام‌رسانی که تومورزایی از طریق التهاب را هدایت می‌کنند، اغلب به صورت یک چرخه‌ی Feed-Forward (پیشرونده و آینده‌نگر) هستند. برای مثال فعال‌شدن NF- κ B در سلول‌های ایمنی باعث القای تولید سایتوکاین‌هایی شده و همین سایتوکاین‌ها باعث فعال‌شدن NF- κ B در سلول‌های سرطانی می‌گردند که این امر باعث القای تولید کموکاین‌هایی می‌شود که سلول‌های التهابی بیشتری را به سمت بافت توموری جذب می‌کند (۲).

در ادامه موضوع سایتوکاین‌ها که بالاتر اشاره شد باید اشاره کرد که هر سایتوکاینی به نوبه خود توسط یک سری تحقیقات و پژوهش‌ها کشف گردیده و نقش(های) آن در انواع اعمال سلولی به مرور به اثبات رسیده است. به طور مثال TNF‌ها اولین بار در سال ۱۹۸۴ جداسازی شدند و در سال‌های مختلف بر روی آن تحقیقات گسترده انجام پذیرفته است. امروزه بر اساس تحقیقات Bharat B. Aggarwal در سال ۲۰۰۳ در آمریکا و Frances Balkwill در سال ۲۰۰۶ می‌دانیم که TNF به عکس معنای اسمش (فاکتور فساد تومور)، عامل تومورزایی و تقسیم، پیشرفت و تهاجم سلول سرطانی محسوب می‌شود (۱۱، ۱۲).

۱-۳ عوامل میکروبی، التهاب و تومورزایی

القای التهاب توسط آلودگی‌های باکتریایی و یا ویروسی ریسک ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد (۱۳). نقش ویروس‌ها در ایجاد سرطان‌ها به خوبی اثبات شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به ویروس‌های آنکوژنیک ^{۱۱}HTLV-1، ^{۱۲}HPV، ^{۱۳}HHV-8، ^{۱۴}EBV، ^{۱۵}HBV و

^{۱۱} Human T-cell leukemia virus type I

^{۱۲} Human papilloma virus

^{۱۳} Human herpes virus 8

^{۱۴} Epstein-barr virus

HCV (۲۵-۱۴) اشاره نمود. این ویروس‌ها می‌توانند با تغییرات اپی ژنتیک، سلول را دست کم به فاز پیش‌سرطانی برده یا این که خود، عامل اصلی شکل‌گیری سرطان باشند. یکی از مکانیسم‌های تغییرات اپی ژنتیک که ویروس‌ها از آن به منظور نامیرا کردن سلول میزبان استفاده می‌نمایند، تغییر وضعیت متیلاسیون DNA ژنومی یا یک ژن خاص است.

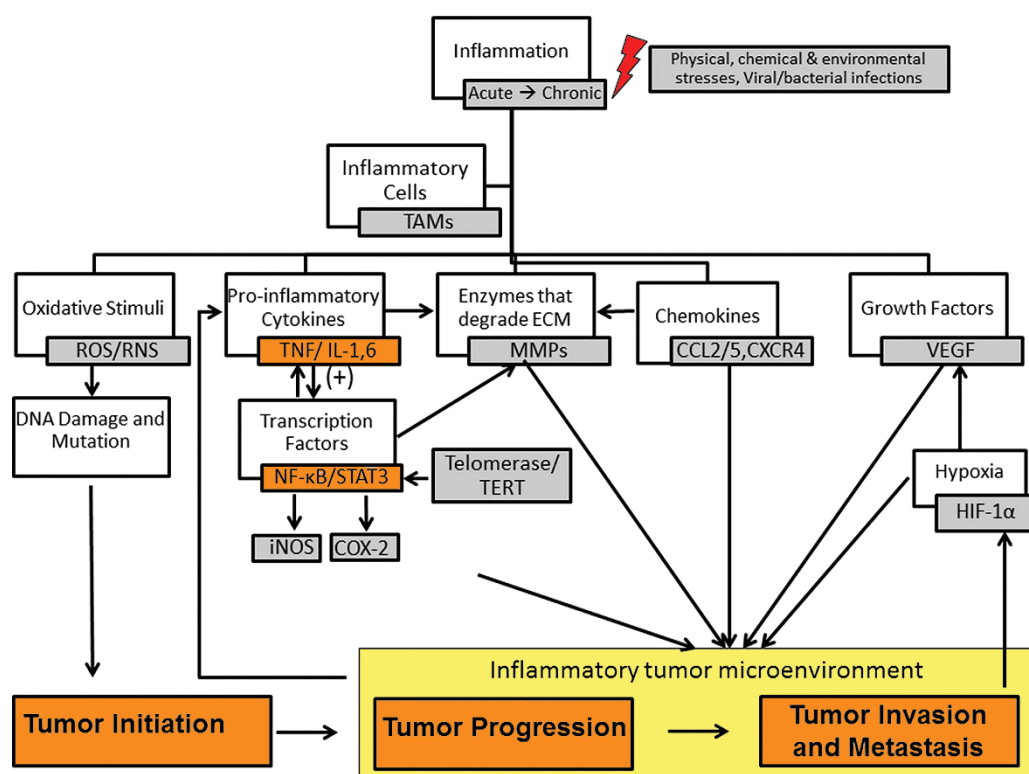
علاوه بر ویروس‌های اشاره شده که نقش آن‌ها در تومورزایی به خوبی نشان داده شده است، پاروویروس B19 نیز در چندین مطالعه، رابطه تنگاتنگی را با سرطان‌های خون از خود نشان داده است. هر چند که هنوز سرطان‌زایی آن به اثبات نرسیده ولی مطالعات، حاکی از احتمال بالای دخالت ویروس در لوسمی‌ها دارد. در مطالعه‌ی Fritch Lilla و همکاران در سال ۲۰۱۵ وجود تیترا بالایی از ویروس در بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد مشخص شده است (۲۶). Vasconcelos و همکاران، وجود عفونت ویروسی را با تغییر اپی ژنتیکی متیلاسیون در لوسمی‌های حاد ارتباط داده‌اند (۲۷). Ibrahem و همکاران نیز ارتباط بین عفونت با این ویروس و لوسمی‌های حاد را مطرح نموده‌اند (۲۸). ارتباط ذکر شده در گزارش Jitschin و همکاران نیز مشاهده می‌شود (۲۹). همچنین، رابطه معنادار بین عفونت با پاروویروس B19 و لوسمی حاد در تحقیقات Alba و همکاران در سال ۲۰۰۶ و دو مطالعه جداگانه‌ی Yetgin و همکاران (۲۰۰۰ و ۲۰۰۴) نشان داده شده است (۳۰-۳۲). به طور خلاصه، مقالات متعددی به این ارتباط پرداخته‌اند که تحقیقات بیشتر سلولی - ملکولی را در این زمینه برای اثبات آن می‌طلبد.

۱۵ Hepatitis B virus

۱۶ Hepatitis C virus

از سال ۱۸۹۸ که اولین ویروس به نام ویروس تنباکو کشف شد، بیش از ۵۰۰۰ نوع ویروس شناسایی شده‌اند (۳۳). پیتون رز برای نخستین بار ویروس سرطان‌زایی را در پرندگان در سال ۱۹۱۱ شناسایی کرد و بعد از او و در سال ۱۹۶۴ آقایان اپشتین و بار، ویروسی مرتبط با سرطان انسانی کشف نمودند که به نام آن‌ها ویروس EBV نامیده شد. اکنون می‌دانیم که این ویروس می‌تواند با آلوده کردن انواع سلول‌ها، طیفی از بیماری‌ها از جمله لوسمی را در انسان به وجود آورد. ویروس‌ها بر حسب نوع ویروس و اندامی که آن را درگیر می‌کنند، می‌توانند سبب ایجاد بیماری از اثرات بدون علامت گرفته تا بیماری‌های بالینی حاد، سندرم‌های نورولوژیک و القای انواعی از سرطان‌ها شوند (۳۴). برخی از ویروس‌ها می‌توانند علیرغم ایمنی فعال در داخل سلول‌ها بدون علامت خاصی نهفته شوند. این نهفتگی در برخی از ویروس‌ها مثل ویروس هرپس (HSV) می‌تواند بدون ایجاد بدخیمی باشد ولی در مورد ویروس پاپیلوما (HPV) باعث ایجاد بدخیمی می‌گردد (۳۵، ۳۶). برآورد می‌شود که نسبت سرطان‌هایی که به دلیل عوامل عفونی از جمله ویروس‌ها ایجاد می‌شوند به ۲۰٪ کل سرطان‌ها می‌رسد؛ بطور مثال، مشارکت ویروس HBV و HCV در سرطان‌های هپاتوسلولار حدود ۸۰٪، ویروس EBV در لنفوم هوجکین ۳۰٪ و ویروس HPV در بیش از ۹۵٪ سرطان‌های سرویکس می‌باشد (۳۷). بسیاری از محصولات آنکوویروس‌ها، عملکردی در جهت اختلال روندهای سلولی همچون سیکل سلولی دارند. اگرچه آنکوویروس‌های مختلف از طرق متفاوتی سبب ایجاد سرطان می‌شوند، وجه مشترک همه آن‌ها هدف قراردادن پروتئین‌هایی مانند p53 و Rb می‌باشد (۳۸). برخی از ویروس‌ها ممکن است حاوی ژن‌هایی باشند که محصول پروتئینی آن می‌تواند سلول را فراگرفته و روند تومورزایی را تسریع کنند. خصوصیت دیگر این ویروس‌ها

آن است که سبب عفونت پایدار^{۱۷} می‌شوند تا از سیستم ایمنی بدن در امان بمانند. در طی عفونت پایدار، ویروس از بیان ژن‌هایی از محتوای ژنتیکی خود که سبب پاسخ ایمنی می‌شوند جلوگیری می‌کند. در این راستا، متیلاسیون DNA ویروس می‌تواند ویروس را در رسیدن به این هدف کمک کند (۳۹).



شکل ۱-۲ تصویر شماتیکی از مسیر شروع یک التهاب توسط عوامل مختلف و نهایتاً تبدیل این سیگنال به تومورزایی و توسعه آن

^{۱۷} Persistent infection

۱-۲ پاروویروس^{۱۸}: B19

۱-۲-۱ معرفی و تاریخچه:

پاروویروس B19 عفونتی فراگیر با شیوع بیش از ۵۰ درصد در جمعیت انسانی است (۴۰) که در سال ۱۹۷۵ توسط خانم Yvonne Cossart (شکل ۱-۲) و همکارانش حین غربالگری آنتی ژن ویروس هپاتیت B در پنل نمونه‌های سرم انسانی کشف شد. اسم این ویروس از نمونه سرمی که به صورت پنل B شماره ۱۹ نام‌گذاری شده بود گرفته شد و به این ترتیب پاروویروس B19 (بیشتر به صورت B19V) نام گرفت (۴۱). این ویروس اولین بار به طور آزمایشی و طبق مشاهدات مورفولوژی اولیه در زیر میکروسکوپ الکترونی جزو پاروویروس‌ها طبقه‌بندی شد و سپس بررسی‌های بیوشیمیایی اولیه ویریون‌ها، خصوصیات معمول پاروویروس‌ها را در آن تأیید نمود (۴۲). پس از آن، ویروس در ژاپن و فرانسه یافت شد و به عنوان عامل سبب‌شناختی عفونت اریتما^{۱۹} در سال ۱۹۸۳ مطرح شد (۴۳-۴۵). تشخیص موثر بیماری تا سال ۱۹۸۵ میسر نبود تا اینکه آزمایشات سرولوژیک و بعد از آن تشخیص DNA ویروس به موضوع تشخیص دقیق ویروس منجر گردید (۴۶).

^{۱۸} Parvovirus B19

^{۱۹} Erythema infectiosum



تصویر خانم Yvonne Cossart که در سال ۱۹۷۵ وی و همکارانش موفق به کشف پاروویروس B19 شدند.

۱-۲-۳ تاکسونومی:

خانواده پاروویریده^{۲۰} شامل ویروس‌هایی با ژنوم DNA تک‌رشته‌ای خطی و کپسید^{۲۱} وجهی^{۲۱} به قطر ۲۰ تا ۲۵ نانومتر و مرکب از ۶۰ زیرواحد پروتئینی است. در این خانواده، زیرخانواده پاروویرینه^{۲۲} شامل ویروس‌هاییست که میزبان آن‌ها مهره‌داران هستند. در این زیرخانواده، جنس اریتروویروس^{۲۳} شامل ویروس انسانی B19 می‌باشد و همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، به صورت مخفف، با نماد B19V نیز نوشته می‌شود. B19V تنها عضوی از خانواده پاروویریده است که موجب بروز بیماری در انسان می‌گردد.

^{۲۰} Parvoviridae

^{۲۱} Icosahedral

^{۲۲} Parvovirinae

^{۲۳} Erythrovirus

به دلیل همانندسازی‌های زیاد، طبقه‌بندی در خانواده پاروویریده با پیچیدگی بیشتری روبه‌روست و همچنان نیز شاهد ازدیاد این پیچیدگی می‌باشیم. در سال‌های اخیر، معرفی تکنیک‌های غربالگری ملکولی متعاقباً امکان شناسایی پاروویروس‌ها را از لحاظ ساختمان ژنتیکی و یا تغییرات توالی و ارائه یک طبقه‌بندی و طرح فیلوژنی جدید فراهم ساخته است. در مورد B19V، تا به حال سه ژنوتیپ جدید از دودمان‌های تکاملی متمایز شناسایی شده و زیرتیپ‌های متمایز دیگر نیز به طور مرتب در حال پیشنهاد شدن هستند (۴۷).

زیر خانواده پاروویرینه دارای سه جنس مهم می‌باشد که عبارتند از:

- ۱- دپندوویروس که جهت تکثیر خود به یک ویروس کمک‌کننده نیاز دارد.
- ۲- پاروویروس که اعضای آن بدون نیاز به ویروس کمکی تکثیر می‌شوند.
- ۳- اریتروویروس که قادر به تکثیر بدون ویروس کمکی فقط در سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی هستند (جدول ۱-۱) (۴۸).

جدول ۱-۱: رده‌بندی خانواده پاروویریده و میزبان هر گونه به طور مجزا. همان‌طور که مشخص است، ویروس B19 متعلق به جنس اریتروویروس می‌باشد.

| میزبان | گونه | جنس | زیر خانواده | خانواده |
|------------|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| مهره‌داران | Mice minute virus | Parvovirus | Parvovirinae | Parvoviridae |
| مهره‌داران | B19 virus | Erythrovirus | | |
| مهره‌داران | Adeno-associated virus 2 | Dependovirus | | |
| مهره‌داران | Aleutian mink disease | Amdovirus | | |

| | | | | |
|--|--------------|-----------------|----------------------------------|------------|
| | | | virus | |
| | | Bocavirus | Bovine parvovirus | مهره‌داران |
| | Densovirinae | Densovirus | Junonia coenia densovirus | بی‌مهرگان |
| | | Iteravirus | Bombyx mori densovirus | بی‌مهرگان |
| | | Brevidensovirus | Aedes aegypti densovirus | بی‌مهرگان |
| | | Pefudensovirus | Periplanta fuliginosa densovirus | بی‌مهرگان |

۱-۲-۴ اپیدمیولوژی و تنوع ژنتیکی:

عفونت با B19V در جمعیت انسانی یک معضل و نگرانی جهانی و فراگیر است. این ویروس می‌تواند در افراد سالم از لحاظ سیستم ایمنی، باعث بروز بیماری‌های حاد و اکثراً خودمحدودشونده^{۲۴} متعدد گردد که شاخص‌ترین آن بیماری پنجم^{۲۵} یا عفونت ایرتما در کودکان است (۴۹). نرخ عفونتی که برآمده از وجود آنتی‌بادی IgG ضد پاروویروس در نمونه سرم می‌باشد در قاره آمریکا، اروپا و آسیا به یک میزان است. برخی بخش‌ها مانند برخی قبیله‌های آمازون و بعضی جزیره‌های ساحلی آفریقا در معرض این ویروس قرار ندارند. آلودگی با این ویروس در کودکان بسیار شایع است و نصف جمعیت نوجوانان ۱۵ ساله

^{۲۴} Self-limiting

^{۲۵} Fifth disease

آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه این ویروس را دارند که نشان از آلودگی است. شیب افزایش نرخ عفونت در بزرگسالان ملایم است اما در کهنسالی سرم اکثر افراد، از لحاظ آلودگی به این ویروس، مثبت^{۲۶} است.

ورود این ویروس به بدن میزبان در وهله اول از طریق قطره‌های تنفسی است و گسترش ثانویه آن از طریق ارتباط افراد نزدیک و هم‌خانه نرخ بالایی دارد. انتقال بیمارستانی آن نیز گزارش شده است. همچنین انتقال B19V می‌تواند از طریق فراورده‌های خونی رخ دهد. پایداری ژنتیکی B19Vها و عدم وجود پوشش لیپیدی موجب شده تا به طور مشهودی به حرارت و دیرجنت‌های حلال مقاوم باشند. از سال ۲۰۰۲ میلادی تولیدکنندگان بزرگ مشتقات پلاسما به طور داوطلبانه اندازه‌گیری‌های کمی DNA ویروس B19 را برای محصولات خود انجام می‌دهند تا ریسک انتقال و شیوع این ویروس را در پزشکی کاهش دهند (۵۰).

همان‌طور که اشاره شد عفونت پاروویروس B19 یک عفونت شایع محسوب می‌شود؛ اگر از لحاظ آمار، دقیق‌تر شویم شیوع سرولوژیک همزمان با سن افزایش می‌یابد و بین ۲ تا ۱۰ درصد در کودکان زیر ۵ سال و از ۴۰ تا ۶۰ درصد در بالغین بیشتر از ۲۰ سال و بیش از ۸۵ درصد در جمعیت کهنسال شایع می‌باشد (۵۱).

تا کنون موارد محدودی از تنوع ژنتیکی میان زیرگونه‌های مختلف ویروس B19 گزارش شده است و تنها یک پروتوتایپ از این ویروس وجود دارد که بنظر می‌رسد تمامی isolateها از آن منشأ گرفته‌اند (۵۲). ویروس B19 دارای سه ژنوتیپ می‌باشد. ژنوتیپ ۱ شامل ویروس B19 اولیه و دو ژنوتیپ جدید است که تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردار است (بیش از ۹٪

^{۲۶} Seropositive

واگرایی نوکلئوتیدی در کل ژنوم) (۵۳؛ ژنوتیپ ۲ شامل نژاد Lali (۵۴) و نژاد A6 (۵۵) می‌باشد. ژنوتیپ ۳a نیز شامل نژاد V9 (۵۶) بوده و ژنوتیپ ۳b نژاد D91.1 را در بر می‌گیرد (۵۳).

شیوع هر یک از این ژنوتیپ‌ها بستگی به موقعیت جغرافیایی، جمعیت و نوع نمونه دارد. به طور مثال در بیوپسی‌های بافتی شیوع ژنوتیپ‌های مختلف از ۲۸٪ (۵۷) تا ۸۱٪ برای ژنوتیپ ۱ (۵۸)، از ۸٪ (۵۹) تا ۷۱٪ برای ژنوتیپ ۲ (۵۷) و از صفر درصد تا ۵۰٪ (۵۷، ۶۰) برای ژنوتیپ ۳ (۵۹) متغیر می‌باشد. یک مطالعه بر پایه بررسی وجود DNA ویروس B19 در بافت‌های مختلف پیشنهاد کرده است که ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ ویروس B19 در اروپای شمالی در طی نیم قرن اخیر به طور مساوی جریان داشته است و بعد از این دوره ژنوتیپ ۲ ویروس ناپدید شده است. مشخص شده است که ژنوتیپ ۲ ویروس B19 اختصاص به افرادی دارد که قبل از سال ۱۹۷۳ به دنیا آمده‌اند و ژنوتیپ ۳ هرگز در این ناحیه در طی ۷۰ سال اخیر شایع نشده است (۶۰). در پلاسماهای حاصل از خون‌های اهدا شده فنلاند فقط ژنوتیپ ۱ شناسایی شده است (۶۱). مطالعه جدیدی بر پایه تحلیل فیلوژنتیکی توالی ژنی پاروویروس مؤید این موضوع می‌باشد که در سراسر جهان ژنوتیپ ۱ غالب است و پیشنهاد شده است که ژنوتیپ ۳b گسترش می‌یابد. پژوهشی از یازده کشور اروپایی، آسیایی و آفریقای غربی نشان داده است که ۹۱٪/۵ بیماران دچار تب یا بثورات پوستی با ژنوتیپ ۱ اریتر ویروس B19 آلوده شده‌اند و تنها ۸٪/۵ توسط ژنوتیپ ۳ ویروس آلوده شده‌اند. ژنوتیپ اخیر در برخی از نقاط آفریقای غربی و همچنین در ۳ کشور غیر آفریقایی غالب می‌باشد. تنوع بالای ژنتیکی ژنوتیپ ۳ در مقایسه با ژنوتیپ ۱ و ۲ احتمالاً حاکی از تاریخچه تکاملی طولانی‌تر در آفریقا دارد (۶۲).

خصوصیات پاتوژنیک ژنوتیپ‌های ۲ و ۳ مشابه با تظاهراتی است که در عفونت با ویروس ژنوتیپ ۱ دیده می‌شود.

۱-۲-۵ ژنوم پاروویروس:

۱-۲-۵-۱ ساختار ژنومی:

نام ویروس مشتق از کلمه parvus می‌باشد که در لاتین به معنای کوچک است. میانگین قطر ویروس در حدود ۲۶ نانومتر بوده و دارای چگالی معادل ۱/۳۹ تا ۱/۴۲ گرم در سانتی‌متر مکعب در کلریدسزیم است. ذره ویروسی حاوی ۶۰ ملکول کپسید است که به صورت متقارن بیست‌وجهی^{۲۷} ساختار آن را تشکیل می‌دهند (۶۳). ویروس دارای ملکول DNA تکرشته‌ای خطی به طول ۵/۵۹ کیلوباز می‌باشد (۶۴, ۶۵). ویروس B19 هر دو فرم مثبت و منفی DNA ویروسی را به طور مساوی کپسیددار می‌کند (۶۶). دو توالی تکراری معکوس انتهایی (ITR^{۲۸}) شامل ۳۸۳ نوکلئوتید در دو سمت ۳' و ۵' ژنوم می‌باشد (۶۷). پیشنهاد شده است که در ذره ویروسی با وجود آن که ۹۵٪ توالی ITR ساختار پالیندرومی دارد، DNA به صورت خطی باقی می‌ماند (۶۸). پس از آلوده‌سازی سلول هدف، DNA ویروسی وارد هسته سلول می‌شود. مکانیسم دقیق ورود DNA به هسته معلوم نیست ولی عنوان شده است که فعالیت فسفولیپاز A2، مرتبط با پروتئین کپسید ویروس است که احتمالاً در برداشتن کپسید و ورود DNA ویروسی به هسته نقش دارد (۶۹).

^{۲۷} Icosahedral

^{۲۸} Internal tandem repeat

در درون سلول، پالیندروم توالی ITR در نواحی ۳' و ۵' شکل می‌گیرد و ۲ ساختار سنجاق‌سری به طول ۳۶۴ نوکلئوتید ایجاد می‌گردد. توالی DNA ویروسی برای اولین بار توسط Shade به دست آمد اما اطلاعات قطعی توسط Deiss و Gallinella گزارش شد (۶۷، ۷۰). در ناحیه ITR سمت ۳' ژنوم، ۳ نوکلئوتید غیر هم جفت وجود دارد (نوکلئوتیدهای ۱۶۱، ۱۶۳ و ۱۶۶) و ۲ نوکلئوتید آدنین اضافی نیز موجود است (نوکلئوتیدهای ۱۴۸ و ۱۴۹). در ناحیه ITR سمت ۵' ژنوم همین تغییرات مشاهده می‌گردد (شکل ۲-۱). تکثیر DNA ویروسی از سمت ۳' ITR آغاز می‌شود و DNA تک‌رشته به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌گردد (۷۰).

تنها پروموتر شناخته شده دارای عملکرد ویروس به نام پروموتر P6 در ناحیه ۳' ITR ژنوم قرار گرفته است و سبب تولید حداقل ۹ نوع mRNA شناخته شده از ژنوم ویروس B19 می‌گردد. رونویسی از ژنوم پاروویروس B19 و تولید mRNAهای ویروسی با استفاده از پروموتر P6 و از نقطه آغاز رونویسی در نوکلئوتید ۳۵۰ آغاز می‌شود و فقط mRNA ژن NS1 به صورت مستقیم و بدون پردازش سنتز می‌شود. سایر mRNAهای ویروسی با واسطه فرایند پردازش فرعی تولید می‌گردند (۷۱، ۷۲). پروتئین‌های ویروس B19 شامل یک پروتئین غیرساختاری (NS1)، دو پروتئین ساختاری کپسید (VP1 و VP2) و دو پروتئین کوچک با وزن‌های ملکولی ۷/۵ و ۱۱ کیلودالتونی می‌باشند (شکل ۲-۱) (۷۰، ۷۳-۷۶).

به سلول برای آغاز فاز S سیکل سلولی (بخشی از سیکل سلولی که در آن، سلول، DNA خود را دو برابر می‌کند) ندارند. بنابراین تکثیر کامل ویروس B19 فقط در سلول‌هایی که در حال تقسیم هستند رخ می‌دهد.

۱-۲-۶-۱ نحوه تکثیر ژنوم

به دلیل آنکه DNA پلیمرازهای سلولی جهت شروع سنتز DNA نیاز به آغازگرهایی دارند که با استفاده از گروه 3'-OH آن بتوانند سنتز DNA را شروع کنند؛ توالی‌های پالیندرومی ویروس B19 به عنوان پرایمر عمل کرده و سبب ایجاد کپی‌های کامل از ژنوم می‌شوند که می‌توانند به فرم کانکاتامری تولید شوند (۷۷).

مدل چرخش سنجاق‌سری اولین مدلی بود که به عنوان مکانیسم تکثیر DNA پاروویروس توسط Tattersall پیشنهاد گردید (۷۸). در این مدل پیشنهاد می‌شود که تکثیر DNA از انتهای ۳' ژنوم آغاز می‌شود. این ناحیه به عنوان پرایمر عمل کرده و سنتز DNA تا انتهای سمت ۵' ژنوم ادامه می‌یابد. به دلیل ماهیت پالیندرومی ناحیه ۵' تازه ساخته شده، تشکیل یک سنجاق‌سر داده که این اجازه را می‌دهد رشته تازه ساخته شده به عنوان الگو برای تکثیر بیشتر مورد استفاده قرار گیرد. نتیجه، تولید کانکاتامری حاوی DNA الگو و مکمل است که به صورت کوالانس از انتها به همدیگر متصل شده‌اند.

۱-۲-۶-۲ عوامل سلولی مورد نیاز ویروس جهت تکثیر

پاروویروس‌ها بسیار وابسته به اجزای کمپلکس تکثیری سلول میزبان جهت تکثیر ژنوم خودشان هستند. پاروویروس بدون توجه به آنکه در چه زمانی از سیکل سلولی، توانسته است وارد سلول شود، بایستی تا زمان ورود سلول به فاز S بدون تکثیر باقی بماند. این مسئله با اندازه‌گیری‌های دقیق DNA ویروسی پس از ورود ویروس به سلول میزبان به اثبات رسیده

است (۷۹). در عفونت پاروویروسی، پروتئین‌های سلولی به صورت کمپلکس با DNA پاروویروسی یافته شده‌اند (۸۰). DNA پلیمراز α مهم‌ترین پلیمراز سلولی برای تکثیر ژنوم ویروس محسوب می‌شود و البته DNA پلیمراز γ نیز بدین منظور مورد نیاز می‌باشد. مطالعه بر روی روند تکثیر ژنوم ویروس با استفاده از مهارکننده‌های اختصاصی آفیدیکولین و ddTTP نشان داده است که تبدیل DNA تکرشته ویروس به DNA دورشته‌ای شامل جابه‌جایی DNA حین تکثیر و شروع آن توسط DNA پلیمراز α آغاز شده و توسط DNA پلیمراز γ ادامه می‌یابد (۸۱-۸۳).

علاوه بر DNA پلیمرازهای سلولی، عوامل سلولی دیگری نیز در تکثیر ژنوم ویروس دخالت دارند. پروتئین متصل شونده به DNA تکرشته‌ای و PCNA در تکثیر *in vitro* ویروس مورد نیاز می‌باشند (۸۳). فاکتور دیگری با نام فاکتور آغاز کننده پاروویروسی مشخص شده است که برای تکثیر ویروس حیاتی می‌باشد. این فاکتور به موتیف‌های ACGT متصل شده و با همکاری پروتئین NS1 ویروسی در شروع سنتز DNA نقش ایفا می‌نماید (۸۴). فاکتور دیگری که از خانواده پروتئین‌های گروه high mobility 1/2 می‌باشد، در عملیات ایجاد شکاف در DNA که توسط پروتئین ویروسی NS1 انجام می‌شود، مشارکت دارد. به‌کارگیری دسته وسیعی از پروتئین‌های سلولی دخیل در ترمیم و تکثیر DNA، توسط ویروس نشان می‌دهد که ویروس برای تکثیر خود باید از مکانیسم‌های ترمیمی سلول نیز کمک بگیرد. از دیگر نمونه‌های آن، افزایش و فعالیت ملکول‌های سیستم ترمیمی مانند ATR و PARP است که اثبات می‌کند ویروس با استفاده از توان ترمیمی سلول مبادرت به تکثیر DNA خود می‌نماید. البته مشاهده شده است که این مسیرها در صورت فعالیت می‌توانند سبب آپوپتوز سلولی شوند (۸۵).

۳-۶-۲-۱ فاکتورهای ویروسی دخیل در تکثیر

دو فاکتور مهم ویروسی جهت تکثیر DNA وجود دارد:

۱- توالی‌های پالیندرومی ژنوم ویروس که نقش آغازگری شروع سنتز DNA را دارند.

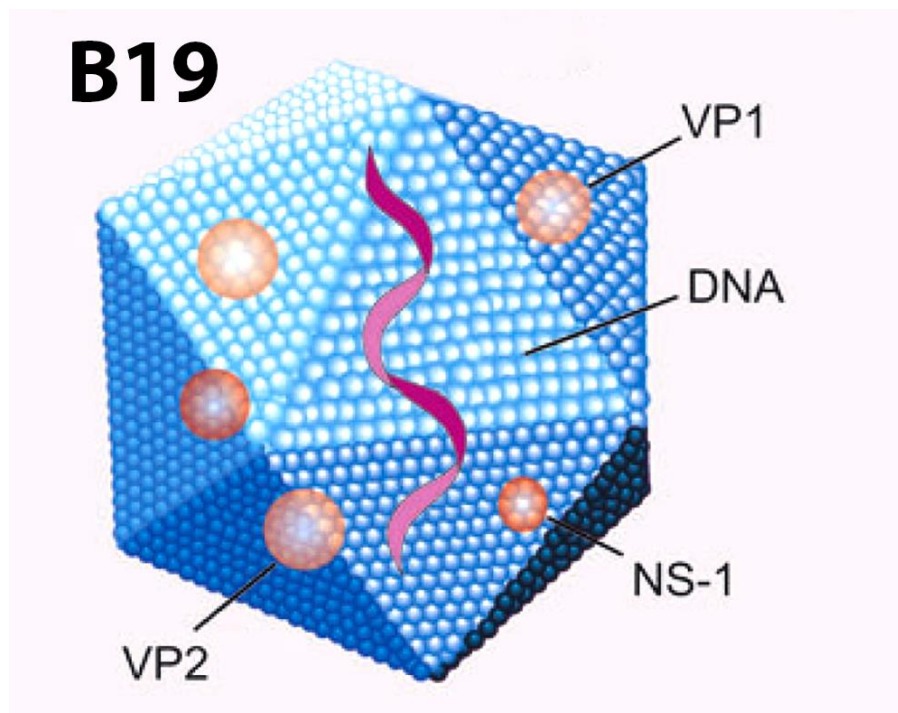
۲- پروتئین NS1 پاروویروس که نقش اساسی در تکثیر DNA و نیز نسخه‌برداری از ژنوم را بر عهده دارد.

علاوه بر نقش آغازگری که برای توالی‌های پالیندرومی ذکر شد، به دلیل وجود سه جفت نوکلئوتید غیر هم جفت که تشکیل در اصطلاح حباب‌هایی را در این ناحیه می‌دهند، پروتئین NS1 ویروس با شناسایی این حباب‌ها می‌تواند محل دقیق برش در رشته DNA را شناسایی کرده و سبب شروع تکثیر DNA شود. نشان داده شده است که NS1 پس از برش، به صورت کوالان به این ناحیه اتصال می‌یابد. به دلیل مشابهت کامل دو توالی ITR در ویروس B19 -بر خلاف آنچه که در پاروویروس‌های هم‌خانواده وجود دارد- پروتئین NS1 ویروس می‌تواند سبب برش DNA از هر دو سو و آغاز سنتز DNA گردد (۸۶-۸۸).

۱-۲-۷ پروتئین‌های پاروویروس B19

ساختار ویروس B19 بسیار ساده است. ویریون آن از دو پروتئین پوششی تشکیل شده که ژنوم تکرشته‌ای ویروس را دربرمی‌گیرد. دو پروتئین ساختاری ویروس به نامهای VP1 و VP2 کپسید ویروس را ایجاد می‌کنند و پروتئین غیرساختاری NS1 در فرایندهای تکثیری و رونویسی ویروس دارای نقش می‌باشد. خانواده‌ای از پروتئین‌های کوچک که حاصل پردازش فرعی بر روی mRNA اولیه هستند؛ شامل پروتئین‌های ۱۱ و ۷/۵ کیلودالتونی هستند که در سلول‌های آلوده حضور دارند ولی عملکرد آنها هنوز روشن نشده است (۷۶). مشخص شده

است که پروتئین VP2 بیش از ۹۰٪ ساختار پوششی ویروس را تشکیل می‌دهد (۷۳). پروتئین NS1 ویروسی توانایی اتصال کوالان به DNA ویروس را داشته و می‌تواند در مقادیر بسیار کم در ویرونها، عفونت‌زا، وجود داشته باشد (۸۹).



شکل ۱-۴ تصویر شماتیک از B19V، کپسید و پروتئین‌های NS-1، VP1 و VP2

۱-۲-۷-۱ پروتئین NS1

پروتئین NS1 یک پلی پپتید ۸۴ کیلودالتونی غیر ساختاری است که به DNA ویروسی اتصال می‌یابد و در ساختار ویرون کامل به سلول هدف انتقال می‌یابد. ویروس B19 در مقایسه با دیگر ویروس‌های هم‌خانواده آن مانند ویروس‌های MVM و AAV که دارای دو پروتئین غیرساختاری هستند، فقط پروتئین NS1 معادل آن‌ها را دارد. NS1 عملکردهای مختلفی را بر عهده دارد. NS1 توانایی اتصال به ملکول ATP را داشته و می‌تواند با شکستن آن، فعالیت

هلیکازی از خود نشان دهد (۹۰). به دلیل فعالیت هلیکازی این پروتئین توانایی باز کردن DNA دورشته‌ای و تبدیل آن به تک‌ رشته را دارد که این فرایند در طول تکثیر ژنوم ویروس بسیاری حیاتی می‌باشد. همچنین این پروتئین با فعالیت Nickase خود می‌تواند سبب ایجاد خاستگاه تکثیر در بدو شروع و در حین همانندسازی ژنوم ویروس گردد. در صورت عدم حضور NS1 یا موتاسیون آن، تکثیر ژنوم ویروس متوقف خواهد شد و این نشان از اهمیت این پروتئین در تکثیر ویروس دارد (۹۱). نقش این ویروس در جداسازی نسخه‌های منفرد ژنوم تکثیر شده نیز به اثبات رسیده است (۹۲). با توجه به توانایی NS1 در انجام فعالیت هلیکازی و ایجاد برش در تک‌ رشته DNA این سوال مطرح می‌شود که آیا NS1 می‌تواند روی DNA میزبان نیز سبب ایجاد nick شود که در این صورت به عنوان یک صدمه DNA محسوب شده و احتمالاً ناحیه آسیب دیده توسط پروتئین PARP شناسایی شده و مسیرهای ترمیمی در سلول وابسته به ATR شروع خواهد شد.

NS1 به عنوان یک تقویت کننده پروموتور خود ویروس B19 یعنی P6 شناخته شده است. بدین ترتیب که NS1 با اتصال به توالی خاصی در ناحیه پروموتور P6 می‌تواند سبب تقویت پروموتور و افزایش نسخه‌برداری از ژنوم ویروس گردد (۹۳). با آلوده‌سازی رده سلولی UT-7 با ویروس B19 اولین بیان ژنی که مشاهده خواهد شد مربوط به NS1 می‌باشد که در مدت زمانی کمتر از ۶ ساعت پس از آلوده‌سازی اتفاق می‌افتد. نتایج نورترن‌بلات نشان می‌دهد که mRNA کدکننده VP1,2 حتی بعد از ۲۰ ساعت از آغاز آلوده‌سازی سلول‌ها ظاهر نمی‌شوند. تولید اولیه NS1 اجازه تنظیم رونویسی ژن‌های ساختاری را می‌دهد. افزودن NS1 به آزمون نسخه‌برداری *in vitro* با استفاده از پروموتور P6 نشان از افزایش نسخه‌برداری ژن گزارشگر داشته است (۹۳). با استفاده از مطالعات جهش‌زایی در توالی‌های تنظیمی پروموتور P6

ویروس، مشخص شده است که نواحی cis پاسخ دهنده به NS1 در جایی بین نوکلئوتیدهای ۱۰۰ تا ۱۶۰ و ۲۳۳ تا ۲۹۸ قرار دارند که در صورت حذف یا جهش در آن‌ها پاسخ به NS1 مشاهده نخواهد شد (۹۴). برهمکنش NS1 با فاکتورهای نسخه‌برداری سلول یکی دیگر از عوامل فعال‌کننده رونویسی از ژنوم ویروس B19 می‌باشد. NS1 با SP1 و SP3 تشکیل کمپلکسی می‌دهد که مستقیماً به DNA ویروسی در ناحیه پروموتری متصل شده و سبب تغییر کنفورماسیون DNA و احتمالاً فراخوانی فاکتورهای دیگری می‌گردد و به واسطه آن، عملکرد پروموتر تقویت می‌شود (۹۵).

عملکرد فعال‌کنندگی NS1 محدود به خود ویروس نمی‌شود بلکه مشخص شده است که NS1 می‌تواند با فعالیت ترانس سبب القای پروموتر LTR ویروس HIV گردد. از طرف دیگر این نوع فعالیت NS1 در مورد القای بیان ژن‌های سلول میزبان نیز مشاهده شده است. با استفاده از آزمایش‌های انتقال موقت ژن به سلول‌های میزبان ویروس B19 توانایی NS1 در القای پروموتر ژن IL-6 به اثبات رسیده است. NS1 با اتصال به فاکتور رونویسی NF- κ B و اتصال آن به پروموتر ژن IL-6 سبب افزایش بیان IL-6 و آغاز مسیرهای التهابی در سلول می‌گردد (۹۶، ۹۷).

تنظیم عملکردهای NS1 در یک آلوده‌سازی موفق ویروس B19 حیاتی محسوب می‌شود. با توجه به سیتوتوکسیک بودن پروتئین‌های غیرساختاری ویروس‌های خانواده پاروویریده، فعالیت بیش از حد ممکن است سبب مرگ سلول میزبان قبل از آن که ویروس بتواند در درون سلول ژنوم خود را تکثیر و کپسید را تولید کند، بشود. یکی از مکانیسم‌های تنظیمی NS1، فسفوریلاسیون آن می‌باشد. مشخص شده است که در صورتی که NS1 هایپوفسفریله شود توانایی آن جهت برش DNA، خاصیت هلیکازی و فعالیت ATPase آن به شدت کاهش

می‌یابد. به واقع عمده فسفریلاسیون NS1 در داخل سلول در دومین هلیکازی آن رخ می‌دهد که می‌تواند گویای این مطلب باشد که فسفریلاسیون نقش مستقیمی در بازکردن DNA داراست. NS1 هایپوفسفریله نمی‌تواند سبب شروع سنتز DNA گردد. NS1 در داخل سیتوزول تشکیل هوموالیگومر می‌دهد. تشکیل الیگومر NS1 جهت انجام وظایف اصلی این پروتئین حیاتی محسوب می‌شود. NS1 مانند دیگر هلیکازها بایستی جهت انجام فعالیت تشکیل الیگومر دهد. NS1 همچنین با پروتئین‌های دیگر سلولی تشکیل هتروالیگومر می‌دهد. از جمله این کمپلکس‌ها، کمپلکس APAR یا اجسام APAR است که شامل پروتئین‌های PCNA، پروتئین‌های TRP غنی از گلوتامین و Cyclin A می‌باشد. این کمپلکس در نواحی فعال در سنتز DNA احتمالاً محل‌های تکثیر ژنوم ویروس، مشاهده شده است. NS1 با برهمکنش با فاکتور رونویسی بنام PIF توانایی اتصال به موتیف‌های ACTG ژنوم ویروس را پیدا می‌کند و فقط در حضور این فاکتور است که NS1 می‌تواند در DNA برش ایجاد کند (۹۸-۱۰۱).

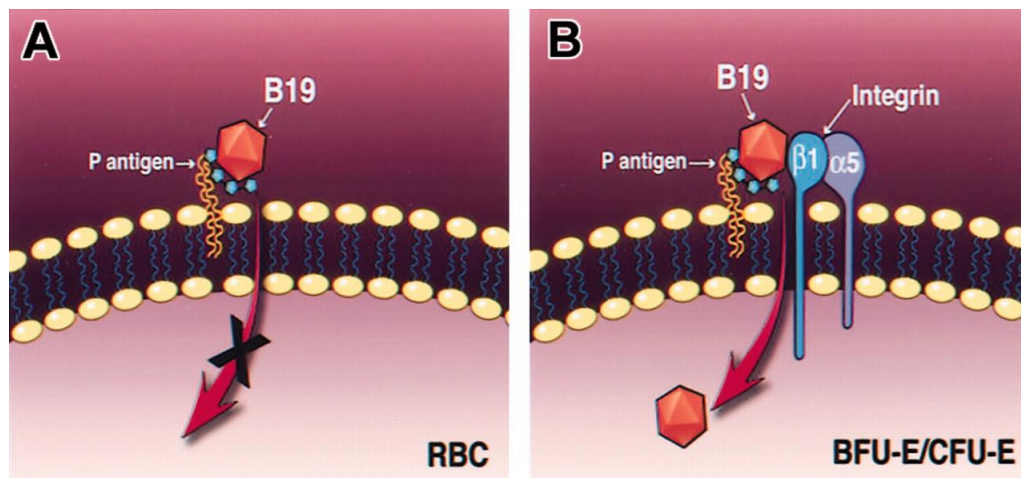
۲-۷-۲-۱ پروتئین VP

VP1 پروتئین ۸۳ کیلودالتونی و VP2 پروتئین ۵۶ کیلودالتونی کپسید ویروس B19 می‌باشد. دو پروتئین یکسان هستند ولی VP1 یک ناحیه N-terminal 226 آمینواسیدی اضافی دارد. VP1 در سطح ویریون بیش از پروتئین VP2 در معرض قرار می‌گیرد و به همین دلیل آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس یکی از اپی‌توپ‌های این پروتئین را شناسایی می‌کنند. پروتئین VP1 و نیز VP2 توانایی تجمع هوموالیگومری را ندارند و فقط به صورت هتروالیگومر VP1/VP2 تشکیل کپسید می‌دهند. VP1 حاوی توالی‌های آمینواسیدی ۱۳۰ تا ۱۹۵ است که موتیف پروتئینی است که خاصیت فسفولیپاز A2 دارد. VP2 بیش از ۹۰٪

پروتئین‌های کپسید را شامل می‌شود و نقش اصلی را در پوشش DNA تکرشته ویروس برعهده دارد (۱۰۲، ۱۰۳).

۸-۲-۱ گرایش پاروویروس B19

گیرنده سلولی جهت اتصال و ورود ویروس، ملکول گلوبوساید یا آنتی ژن P گروه‌های خونی می‌باشد. پاروویروس می‌تواند سبب آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز خون با واسطه گلوبوساید شود (۱۰۴). گلوبوساید بطور انبوه در سطح گلبولهای قرمز و پیش سازهای آن وجود دارد. افراد دارای گروه خون P بطور کلی نسبت به عفونت با ویروس B19 مقاومند و در آنها آنتی بادی ضد ویروسی شکل نمی‌گیرد. در ابتدا به دلیل آنکه رده اریتروئیدی حاوی مقادیر بالای گلوبوساید هستند تصور می‌شد که عامل تروپیسم ویروس به سلول‌های اریتروئیدی به این دلیل می‌باشد. بعداً مشخص گردید که این ملکول بر سطح انواع سلول‌های مختلف دیگری وجود دارد (۱۰۵، ۱۰۶). برای مثال سلول‌های کبدی گلوبوساید را در سطح خود بروز می‌دهند ولی برای ویروس ناپذیرا هستند. ناحیه‌ای از پوشش ویروس که مسئول اتصال به سلول می‌باشد در موتیفی از پروتئین VP2 واقع است. این احتمال وجود دارد که آنتی بادی‌های خشی‌کننده ویروس به این ناحیه خاص متصل شده و جلوی ورود ویروس به سلول را می‌گیرند (۱۰۰).



شکل ۱-۵. A. عدم ورود B19V به گلبول‌های قرمز بالغ با وجود بیان آنتی‌ژن P (گلوبوساید). B. ورود B19V به داخل سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی به دلیل وجود اینتگرین در کنار آنتی‌ژن P (گلوبوساید).

دلایلی که برای گرایش ویژه ویروس به سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی و تکثیر کامل یعنی تشکیل ویریون‌های جدید مطرح شده است بسیار پیچیده و گسترده می‌باشند. از جمله مکانیسم‌های پیشنهاد شده می‌توان به فرایندهایی همچون؛ ورود ویروس، نسخه‌برداری، پردازش، پلی‌آدنیلایسیون، تکثیر DNA و ترجمه اشاره نمود. تکثیر موفقیت آمیز ویروس در سلول پیش‌ساز اریتروئیدی گویای این موضوع است که عامل یا عوامل تقویت‌کننده ویژه‌ای در این سلول‌ها به تکثیر ویروس کمک می‌کنند. بطور مثال افزودن اریتروپویتین به محیط کشت به صورت وابسته به دوز سبب افزایش بازدهی تشکیل ویروس در این سلول‌ها می‌شود. اریتروبلاستهایی که با ویروس آلوده می‌شوند پس از گذشت ۲ روز تخریب شده و ویروس‌ها با چرخه لیتیک از سلول میزبان خارج می‌شوند (۱۰۷، ۱۰۸). سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی مشتق از کبد جنین انسانی بیش از ۱۰ برابر بیشتر از معادل این سلول‌ها در مغز استخوان بالغین تولید ویروس می‌نماید. مشخص شده است که عمده سلول‌های پذیرای ویروس می‌توانند

کلونی‌های CFU-E و BFU-E را تولید بنمایند. کلونی‌های گرانولوسیتی و مونوسیتی نسبت به ویروس B19 ناپذیرا هستند (۱۰۹).

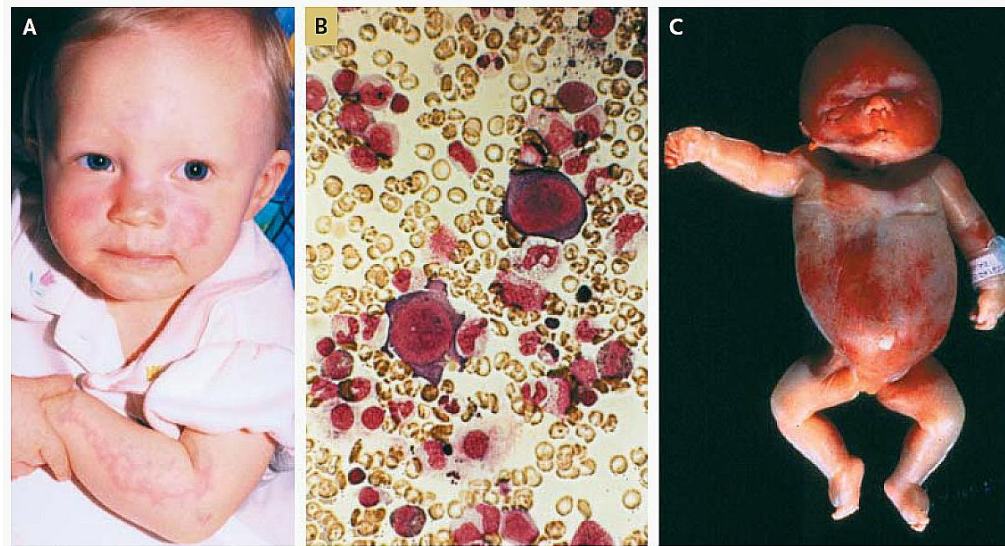
تاکنون تلاش‌های زیادی برای تولید رده‌های سلولی پذیرا یا نیمه پذیرای ویروس B19 انجام گرفته است. بدین منظور رده‌های سلولی اریترولوکمییایی و نیز مگاکاریوسیتیک در محیط کشت تحت تاثیر اریتروپویتین قرار گرفته اند و نشان داده شده است که می‌توانند به صورت نیمه پذیرا (<۱۰٪) جهت تکثیر ویروس به حساب آیند. از مهمترین این رده‌های سلولی می‌توان به UT-7 و MB-02 اشاره نمود. سلول‌های مغز استخوان با کارایی بیش از هزار برابر کاملاً برای ویروس پذیرا می‌باشند (۱۰۸, ۱۱۰).

۱-۲-۹ عفونت مداوم پاروویروس B19

در افراد سالم از لحاظ سیستم ایمنی، عفونت حاد با ویروس B19 اغلب توسط آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس کنترل می‌شود. انتشار سیستمیک ویروس در خون به صورت موقتی در دوره‌ای کمتر از یک هفته اتفاق می‌افتد و با ظهور آنتی‌بادیهای IgM، تیتروسی به شدت کاهش یافته و نهایتاً آنتی‌بادی IgG جایگزین آنتی‌بادی اولیه می‌گردد. در صورتی که سیستم ایمنی بدن فرد دارای نقص باشد و نتواند آنتی‌بادی علیه ویروس تولید بنماید سبب پایدار شدن حضور ویروس می‌گردد (۱۱۱, ۱۱۲). شایان ذکر است که در برخی موارد مشخص شده است که عفونت در مغز استخوان افراد سالم به لحاظ ایمنی، به فرم پایدار در می‌آید. ویروس B19 در بافتها به صورت نهفته باقی می‌ماند و مشخص شده است که می‌تواند با تولید پروتئین NS1 سبب سیتوتوکسیسیتی برای سلول‌های میزبان شود (۱۱۲).

۱-۹-۲-۱ تظاهرات بالینی

همچنان که در سال ۱۹۷۵ کشف گردید، ویروس B19 می‌تواند سبب طیف وسیعی از نشانه های بالینی ملایم و خود محدود شونده ای شود که شامل بیماری پنجم و ایگوارتریت می‌باشد (۱۱۳). عفونت ویروس B19 همچنین سبب بروز علائم هماتولوژیکی همچون کم خونی حاد و بحران آپلازی در بیمارانی می‌شود که دچار خونسازی معیوب اکتسابی یا ارثی، دچار عفونتهای ویروسی HIV، نقص سیستم ایمنی و در حین شیمی درمانی یا دریافت کننده پیوند هستند. ویروس سبب مرگ جنین در رحم می‌شود و از عوامل مهم سقط خودبخودی جنین بشمار می‌رود (۱۱۴، ۱۱۵). به تازگی مواردی از تظاهرات نورولوژیک، قلبی-عروقی، کبدی و بیماریهای خود ایمن ویروس B19 ارائه شده است که لیست بیماریهای مرتبط با این ویروس را به شدت افزایش داده است (۱۱۵، ۱۱۶).



شکل ۱-۹-۲-۱. A. بیماری پنجم یا آرتم عفونی B. بحران آپلازی C. بیماری ادم جنین (hydrops fetalis)

۱-۲-۱ جنبه‌های کلینیکی و پاتوژنتیک عفونت پاروویروس B19

۱-۲-۱-۱ انتقال

انتقال پاروویروس B19 عمدتاً از طریق قطرات تنفسی اتفاق می‌افتد. همچنین می‌تواند توسط گسترش خون آلوده، پیوند عضو و انتقال عمودی از مادر به جنین نیز منتقل گردد. پس از کسب ویروس توسط سیستم تنفسی، یک همانندسازی کوچک در بافت لنفاوی نازوفارنکس رخ می‌دهد و به دنبال آن یک ویرمی گسترده با بار ویروسی رخ می‌دهد که می‌تواند از مرز ۱۰۱۳ mL-1 نیز بگذرد. متعاقباً، پاروویروس B19 در سراسر بدن منتشر و وارد ریز محیط مغز استخوان می‌گردد و سبب عفونت اریتروبلستی کلی می‌شود. لنفوپنی، نوتروپنی و ترومبوسیتوپنی که در طول فاز حاد وایرمیک رخ می‌دهد، قابل توجه نیست. علت ترومبوسیتوپنی مشاهده شده در عفونت با پاروویروس B19 را می‌توان به علت تکثیر ویروس در ترومبوسیت، بدون سنتز پروتئین‌های ساختاری دانست. انتقال ویروس در برخی از گروه‌های بیماران High risk می‌تواند سبب پیامدهای جدی شود:

۱- افراد دچار طول عمر کوتاه گلوبول قرمز (شرایط همولیتیک مزمن)

۲- زنان باردار

۳- بیماران دچار نقص سیستم ایمنی

۱-۲-۱-۳ پاسخ ایمنی به عفونت پاروویروس B19 و مکانیسم‌های دفاعی

عفونت با پاروویروس B19 رویداد شایعی در اطفال و بزرگسالان است و در بیش از ۵۰٪ سبب مصونیت مادام‌العمر می‌شود. عفونت حاد با پاروویروس B19 با واسطه‌ی آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده موجود در پاسخ ایمنی هومورال کنترل می‌شود؛ با ظهور IgM، ویرمی کاهش می‌یابد

و پس از آن IgG مادام العمر علیه پاروویروس B19 ساخته می‌شود. آنتی‌بادی های IgM به طور عمده علیه اپی توپ های ساختاری VP2 عمل می‌کنند. این آنتی‌بادی ها تا چندین هفته پس از ویرمی حاد باقی می‌مانند؛ البته در برخی بیماران تا چندین ماه نیز مشاهده می‌شوند. در مسیر طبیعی پاسخ هومورال، آنتی‌بادی های IgM توسط IgG های علیه ساختار VP1 و VP2 و تا حدی اپی توپ های خطی VP1 جایگزین می‌شود.

۱-۲-۱۰-۴ آنمی مزمن «آپلازی خالص سلول‌های قرمز» (PRCA)

بیماران مبتلا به انواع متفاوت سرکوب سیستم ایمنی ممکن است قادر به پاکسازی موثر پاروویروس B19 نباشند، که می‌تواند منجر به ویرمی با تیترا پایین مداوم همراه با PRCA و آنمی مزمن گردد. PRCA به طور معمول در بیماران دچار اختلال ایمنی با واسطه سلولی که توسط پاروویروس B19 آلوده شده‌اند، به ویژه مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، افراد HIV مثبت، گیرندگان پیوند مغز استخوان و یا کودکان با نقص ایمنی مادرزادی مشاهده می‌شود. این بیماران ممکن است آنمی مداوم به علت همانندسازی مداوم و غیرقابل کنترل پاروویروس B19 و درگیری دائمی پیش سازان اریتروئیدی پیدا کنند.

۱-۲-۱۱ تشخیص B19

۱-۲-۱۱-۱ سیتوپاتولوژی تشخیصی

اگرچه وجود پرونرموبلاست (ابتدایی ترین پیش ساز اریتروئیدی قابل تشخیص) گول پیکر چه در مغز استخوان چه در خون محیطی مطرح کننده عفونت B19 است، نباید از حضور و عدم حضور آن به تنهایی در تشخیص عفونت B19 استفاده کرد. این سلول‌ها اغلب در بیماران مبتلا به عفونت HIV یا عفونت های مزمن وجود ندارند.

۲-۱۱-۲-۱ تشخیص ویروس B19

ویروس B19 عمدتاً از طریق جداسازی DNA ویروسی با هیبریداسیون مستقیم یا PCR تشخیص داده می‌شود. اگرچه هیبریداسیون مستقیم در تشخیص سطح B19 در بحران آپلاستیک گذرا و آپلازی خالص سلول‌های قرمز در بیماران چار نقص سیستم ایمنی به خوبی عمل می‌کند، اما مقادیر پایین ویرمی ممکن است تشخیص داده نشود. ظهور PCR تا حد زیادی سبب افزایش حساسیت تشخیص DNA در نمونه‌های سرم و بافت شد. DNA برای مدت زمان طولانی در سرم، غشاء سینوویال و مغز استخوان قابل تشخیص است که ممکن است شامل افراد سالم نیز بشود، بنابراین وجود سطح پایین B19 DNA به تنهایی نمی‌تواند مبنایی برای تشخیص عفونت B19 باشد.

۳-۱۲-۲-۱ تشخیص آنتی‌بادی

اگرچه آزمایشات تشخیص B19 DNA برای تشخیص عفونت B19 در بحران آپلاستیک گذرا (قبل از پاسخ آنتی‌بادی) و افراد دچار نقص سیستم ایمنی با عفونت‌های مزمن (کسانی که اختلال پاسخ ایمنی دارند) ضروری است، اما تشخیص عفونت در افراد سالم از نظر ایمنی که مبتلا به اریتم عفونی یا آرتروپاتی ناشی از B19 هستند، با تشخیص آنتی‌بادی‌های خاص B19 انجام می‌شود. سنجش IgM معیار قابل اعتمادی برای عفونت فعلی یا اخیر در افراد سالم از نظر ایمنی است. بر این اساس، بیش از ۸۵٪ بیماران مبتلا به اریتم عفونی یا بحران آپلاستیک با منشا B19، IgM‌های اختصاصی را نشان داده‌اند و این آنتی‌بادی‌ها برای ۲ الی ۳ ماه متعاقب عفونت باقی می‌مانند. معمولاً ۲ هفته پس از عفونت، IgG ظاهر می‌شود و در تمام مدت طول زندگی باقی می‌ماند. به طور کلی، تشخیص IgG برای تشخیص عفونت حاد، به جز در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی که قادر به تولید IgM نیستند، سودمند نیست.

۱-۲-۲-۴ تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی NS-1

گروهی از محققین بر این باورند که IgG اختصاصی NS-1 عمدتاً در بیماران مبتلا به آرتریت یا عفونت مداوم B19 یافت می‌شود. اعتقاد بر این است که ویروس خونی طولانی مدت ممکن است منجر به عفونت سلول‌های غیر اریتروئیدی شود، که در آن بیان ژن به سمت رونویسی ژن NS-1 نسبت به ژن‌های VP1 و VP2 شیفت پیدا می‌کند. اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک NS1 ممکن است سبب لیز سلولی و آزادی پروتئین NS-1 شود، در نتیجه این جزء غیرساختای ویروس در دسترس سیستم ایمنی میزبان قرار می‌گیرد. از این رو، مقاومت ویروسی ممکن است یک پیش شرط برای تشکیل آنتی‌بادی‌های اختصاصی NS-1 باشد. در مقابل، هیچ شواهدی مبنی بر وجود IgG NS-1 به عنوان نشانگر عفونت مزمن یا مرتبط با پاتوژن‌ز نیافتند. بسیاری از مطالعات نشان دادند که صرف نظر از بیماری‌های زمینه‌ای، IgG اختصاصی NS-1 در اواخر عفونت پدیدار می‌شود (پس از ۶ هفته)، و آزمایش تشخیص آنتی‌بادی NS-1 در بیماران دچار سرولوژی نامشخص می‌تواند مفید باشد (۱۱۶).

۱-۲-۲-۵ آلودگی سلول‌های غیر اریتروئیدی با پاروویروس B19

به تازگی مشخص شده است که پاروویروس B19 می‌تواند به طیف وسیعی از سلول‌ها وارد شده و به صورت نهفته باقی بماند. نهفتگی در سلول میزبان به معنای عدم فعالیت ویروس نیست بلکه مشخص شده است، ویروس در همین حالت نیز از لحاظ رونویسی، فعال است (۱۱۷-۱۱۹). ویروس B19 در بافتها به صورت نهفته باقی می‌ماند و مشخص شده است که می‌تواند با تولید پروتئین NS1 سبب سیتوتوکسیسیتی برای سلول‌های میزبان شود.

این ویروس عموماً در کودکان سبب بیماری اریتیم عفونی (بیماری پنجم) می‌شود. اگرچه عفونت‌های بدون علامت و تظاهرات کمتر رایج از قبیل آنمی، پانسیتوپنی در بیماران دچار

نقص ایمنی، بحران آپلاستیک گذرا، آرتریت، میوکاردیت، هپاتیت و واسکولیت را نیز سبب می‌شود. سیستم اعصاب مرکزی نیز می‌تواند توسط PVB19 آلوده شود که بیماری‌هایی از قبیل آنسفالیت، مننژیت و نوروپاتی محیطی را به وجود می‌آورد که در طول ۱۰ سال گذشته به طور فزاینده مستند شده‌اند (۱۲۰).

پیش‌تر نیز اشاره شد که این ویروس سبب مرگ جنین در رحم می‌شود و از عوامل مهم سقط خودبخودی جنین بشمار می‌رود (۱۱۴، ۱۱۵). به تازگی مواردی از تظاهرات نورولوژیک، قلبی-عروقی، کبدی و بیماری‌های خود ایمن ویروس B19 ارائه شده است که لیست بیماری‌های مرتبط با این ویروس را به شدت افزایش داده است (۱۱۵، ۱۱۶).

۱-۳ سلول بنیادی مزانشیمی^{۲۹}

۱-۳-۱ تاریخچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs) به عنوان یک بخش مهم آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز (^{۳۰}HSCs) شناخته شده است که برای نگهداری سلول‌های بنیادی خون‌ساز ضروری است. تغییرات آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز به عنوان علت اصلی ^{۳۱}AML در نظر گرفته شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک نقش مهم در پاتوژنز چندین بیماری از جمله اختلالات هماتولوژیکی مانند مالتیپل مایلوما، لوسمی میلوئیدی مزمن، سندروم میلودیس پلازی و لوسمی میلوئیدی حاد دارند. در واقع علاوه بر موتاسیون‌های ژنی

^{۲۹} Mesenchymal stem cells

^{۳۰} Hematopoietic stem cells

^{۳۱} Acute myeloid leukemia

در HSC، تغییرات در آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز ممکن است علت اصلی اختلال میلوئیدهای بدخیم در AML باشد (۱۲۱، ۱۲۲).

در اوایل قرن نوزدهم، قبل از به کارگیری واژه سلول‌های بنیادی، از واژه‌های بازسازی بافت و خودترمیمی استفاده می‌شد. در سال ۱۸۷۶، Cohnheim گزارش داد که سلول‌های مشتق از مغز استخوان که در تسهیل ترمیم زخم نقش ایفا می‌کنند، غیر هماتوپوئیتیک بوده و مورفولوژی شبه فیبروبلاستی دارند. این شواهد آغازی برای تحقیق و بررسی بیشتر درباره سلول‌های بنیادی بود (۱۲۳).

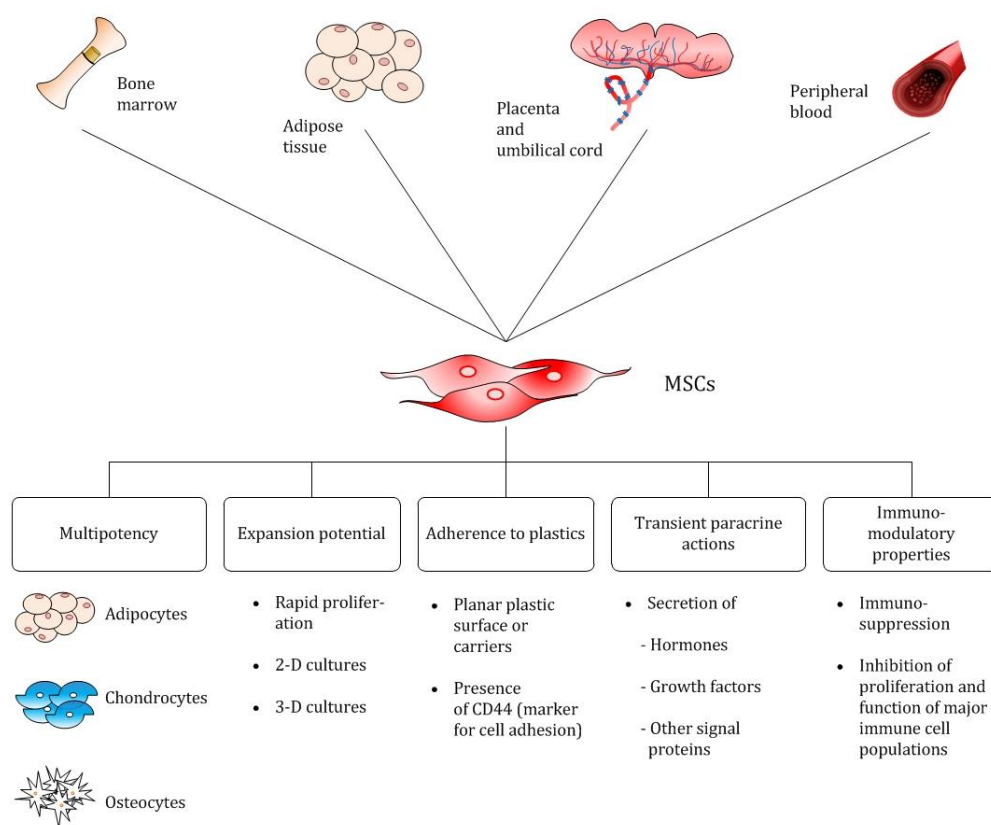
در سال ۱۹۶۶ Friedenstone و همکارانش با انجام چندین آزمایش، جمعیتی از سلول‌های کلونال را که قابلیت چسبندگی، ظاهری شبیه به فیبروبلاست داشتند و از مغز استخوان مشتق می‌شدند، تعریف کردند (۱۲۴، ۱۲۵)؛ که قادر به تمایز به استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها و کندروسیت‌ها بودند و آن‌ها را سلول‌های بنیادی استرومایی^{۳۲} مغز استخوان (BM-SSC) یا سلول‌های استئوژنیک نامیدند.

این سلول‌ها قدرت تکثیر بالایی دارند و با تمایز به کندروسیت، استئوبلاست، آدیپوسیت و سلول‌های استرومال، خون‌سازی را در آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز حمایت می‌کنند. آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز برای نگهداری سلول‌های بنیادی خون‌ساز ضروری است و غالب آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز، از BMSCها تشکیل شده است (۱۲۶، ۱۲۷).

در واقع فریدن اشتاین و همکارانش نشان دادند که مغز استخوان دارای سلول‌های دوکی شکلی (مورفولوژی شبه فیبروبلاستی) است که می‌توانند به صورت کلونی رشد کرده و به

^{۳۲} Stromal stem cells

سلول‌های شبه استخوانی و غضروفی تمایز یابند. (طبیعت کلونالشان زمانی معین شد که سوسپانسیون‌های سلولی به صورت تک کلونی‌های چگال، بر روی محیط کشت کاشته شدند). این کلونی‌های به هم چسبیده در آغاز، واحد ایجادکننده کلونی فیروبلاست نامیده شدند اما امروزه به دلیل توانایی خودنوسازی و تمایز به رده‌های گوناگون مزانشیمی، با عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته می‌شوند (۱۲۸). (شکل ۷-۱).



شکل ۷-۱. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)

در سال ۱۹۷۷ میلادی، زمانی که فرضیه کنام یا همان جایگاه ویژه سلول‌های بنیادی توسط Schofield ارائه شد (۱۲۷)، مفهوم کنترل ویژگی‌های سلول‌های بنیادی خودنوسازی

(خودتجدیدی) و تمایز توسط ریزمحیطها و سلولهای پشтіیان، پیش کشیده شد. در آن زمان بیش تر نگاهها بر روی آزمایشات خونشناسی و مغز استخوان متمرکز بود، بنابراین کنامها را پناهگاه سلولهای بنیادی خون ساز (HSCs) می دانستند؛ که سبب شد دانشمندان تحقیقاتی را درباره رابطه عملکردی میان سلولهای بنیادی هماتوپوئیتیک و اجزای سلولی مغز استخوان آغاز کنند. سرانجام تحقیقات به این نقطه رسید که محققان نوع دوم سلولهای بنیادی را در استرومای پشтіیان خون سازی، در مغز استخوان یافتند.

تحقیقات پیشگامانی چون Friedenstein بر روی BM-SSC نیز این مفهوم را تأیید می کردند که نوع دوم سلولهای بنیادی یافت شده، غیر هماتوپوئیتیک هستند. پس از اینکه توانستند این سلولها را با موفقیت از رویان موش (۱۲۹) و بعدها از انسان (۱۳۰) جداسازی کنند، واژه مزانشیمی جای استرومایی یا استئوژنیک را گرفت تا نام مناسبی برای سلولهای بنیادی غیر هماتوپوئیتیک از مغز استخوان باشد، به این ترتیب بود که واژه سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSCs) به وجود آمد (۱۳۱، ۱۳۲).

۳-۳-۱ معرفی سلولهای بنیادی مزانشیمی

مغز استخوان حاوی دو نوع جمعیت مشخص از سلولهای بنیادی شامل سلول بنیادی هماتوپوئیتیک (HSCs) که ردههای مختلف خونی را ایجاد می کند و مزانشیمی (MSCs) می باشد که این سلولهای بنیادی غیرخون ساز استرومای مغز استخوان حمایت کننده عملکردی و ساختمانی خون سازی بوده و این عمل را از طریق ترشح فاکتورهای رشد و تماس سلول به سلول انجام می دهند. سلولهای بنیادی مزانشیمی، سلولهای بنیادی چندتوانی هستند چندتوان بودن آنها به این معنی است که قادرند به سلولها و بافتهای یک لایه زایا تمایز پیدا کنند و دارای قدرت تکثیر، خودنوسازی بالا و همچنین پتانسیل تمایز به ردههای مختلف سلولی از

جمله سلول‌های استئوبلاست، کندروسیت، آدیپوسیت، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عصبی، سلول‌های میلوسیت قلبی، سلول‌های هپاتوسیت و سلول‌های پانکراس می‌باشند. این سلول‌ها با قدرت تکثیر بالای خود و با تمایز به کندروسیت، استئوبلاست، آدیپوسیت و سلول‌های استرومال، خون‌سازی را در آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز حمایت می‌کنند. آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز برای نگهداری سلول‌های بنیادی خون‌ساز ضروری است و اکثریت آشیانه سلول‌های بنیادی خون‌ساز، از BMSCها تشکیل شده است. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به نام‌های سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSC)، سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان (BMSSC)، سلول‌های فیروبلاستی کلون‌زا (CFU-F) و سلول‌های پیش‌تاز مزانشیمی^{۳۳} (MPC) نیز یاد می‌شود. سلول‌های استرومایی از سلول‌های بافت پیوندی هستند، که ساختار حمایت‌کننده‌ای را شکل می‌دهند و در آن سلول‌های عملکردی نیز یافت می‌شود. بافت مزانشیم، بافت پیوندی رویانی مشتق از مزودرم است که قادر است به سایر بافت‌های پیوندی از جمله رده‌ی سلول‌های خونی تمایز یابد، در حالیکه MSCها فاقد توان تمایز به سمت سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌باشند (۱۲۷، ۱۳۳-۱۳۸).

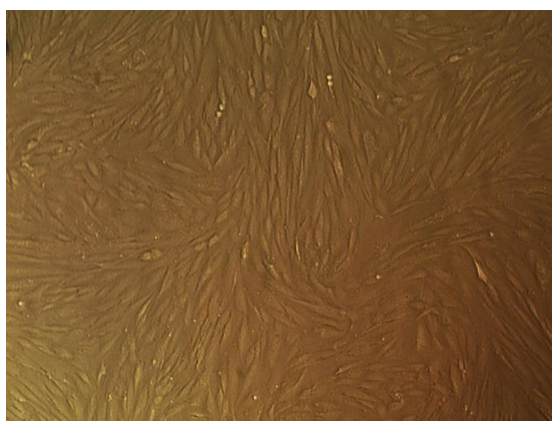
MSCها در استرومای غیرخون‌ساز مغز استخوان یافت می‌شوند. بافت استرومای مغز استخوان از جمعیت بسیار متفاوتی از سلول‌ها درست شده است که شامل سلول‌های رتیکولار، چربی، عضله صاف، استخوان‌ساز، اندوتلیال و ماکروفاژها می‌باشد. در شرایط رشد یا در پاسخ به آسیب، ترمیم و بازسازی بافت استرومایی، توسط MSCها انجام می‌شود. مهم‌ترین منبع

^{۳۳} Mesenchymal progenitor cells

MSCها، استرومای مغز استخوان می باشد اما می توان آن ها را از پریوستئوم^{۳۴}، چربی و پوست نیز جدا نمود (۱۲۶, ۱۳۹, ۱۴۰).

۱-۳-۴ مورفولوژی سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت به صورت سلول های نسبتاً هموزن، دوکی شکل، دارای هسته بزرگ و گرد با هستک واضح و مشخص، تعدادی اندامک داخل سلولی و زواید سلولی بلند و کوتاه و منعکس کننده نور و شبه فیبروبلاست می باشند در شکل ۱-۸ تصویر میکروسکوپ نوری از کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان را مشاهده می کنید (۱۴۱).



شکل ۱-۸. تصویر میکروسکوپ نوری از کشت سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی. سلول های چسبنده تک هسته ای دوکی شکل قابل مشاهده می باشند.

۱-۳-۵ منابع سلول های بنیادی مزانشیمی

مهم ترین منبع جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان می باشد. به دلیل نبود روش مناسب برای جلوگیری از رشد سایر سلول ها در کشت اولیه و پاساژهای سلولی، فرایند

^{۳۴} Periosteum

جداسازی و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان و به دست آوردن جمعیتی هموژن از این سلول‌ها بسیار مشکل است. بنابراین توجه به منابع جایگزین جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بسیار مورد نیاز خواهد بود. MSC‌های انسانی به طور عمده از ستیغ بالایی استخوان لگن به دست می‌آیند (۱۴۲، ۱۴۳). منابع مختلف سلول‌های بنیادی در انسان را می‌توان به صورت تیتروار این گونه نوشت: آئورت، چربی، مایع آمنیوتیک، مغز استخوان، خون، مغز، غضروف، خون بند ناف، پالپ دندان، آندومتر، چشم، گلو، قلب، کلیه، کبد، ریه، ماهیچه، پانکراس، جفت، غدد بزاقی، پوست، طحال، غشای سینوویال، تاندون، تیموس، بند ناف و رگ.

۱-۳-۶ مارک‌های شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

برای جداسازی و تشخیص MSC‌ها از مغز استخوان به طور روتین از الگوی بیان مارک‌های سطحی توسط فلوسایتومتری استفاده می‌شود. اما باید در نظر داشت که MSC نمی‌تواند تنها توسط بیان یک مارکر پروتئینی تشخیص داده شود؛ باید دانست که ایمونوفنوتایپینگ MSC‌ها تحت شرایط گسترش *invitro* دچار تغییرات بارز می‌شود، که شامل کاهش CD10، CD13، HLADR و افزایش CD105 و CD146 می‌باشد (۱۲۸، ۱۴۴).

بنابراین جامعه بین‌المللی سلول درمانی (ISCT)، معیارهایی را برای MSC‌ها عنوان کردند که به شرح زیر است:

۱. چسبیدن به پلاستیک ۲. توانایی تمایز به سه رده مزودرمال کندروسیت، استئوبلاست و آدیپوسیت تحت شرایط استاندارد تمایز ۳. بیان *invitro* مارک‌های سطحی CD105، CD73، CD44، CD90 و عدم بیان مارک‌های هماتوپویتیکی CD45، CD34، CD14، CD11b، CD79a، CD19 و HLADR. اما این معیارها به طور کامل مفید نیستند، زیرا بر اساس

مشاهدات مصنوعی *invitro* استوار هستند و هنوز برای تشخیص آن‌ها در *in vivo* معیار دقیقی نداریم و از طرفی مارکرهای ایمونولوژیکی نیز، طی کشت در *invitro* دچار تغییر می‌شود (۱۲۴، ۱۲۵، ۱۴۵).

در حال حاضر هیچ مارکر یا ترکیبی از مارکرهای اختصاصی وجود ندارد که منحصراً سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تعیین کند. با این حال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی و موش در شرایط *ex vivo*، در مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که آنتی‌ژن‌هایی چون Sca-1، CD29، CD106، CD105، CD90، CD73 و CD44 را بیان کرده و خالی از مارکرهای خون‌سازی چون CD34 و CD45 و مارکرهای اندوتلیالی و ماکروفاژی CD14، CD11b و CD31 هستند. بیان سطحی کمپلکس سازگاری بافتی کلاس ۱ (MHCI) در موش‌ها، یا آنتی‌ژن لکوسیت انسانی (HLA) زیرگروه A، B و C در انسان‌ها پایین، حد واسطه یا جزئی گزارش شده است، اما MHCI در موش‌ها و HLA-DP، HLA-DQ و HLA-DR در انسان‌ها اصلاً حضور ندارند. مهم‌تر اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انسان‌ها و موش‌ها، مولکول‌های کمک تحریکی (CD80 (B7-1)، CD40 و CD86 (B7-2) یا لیگاند آن CD40L را بیان نمی‌کنند (۱۳۷، ۱۴۶).

همان‌طور که قبلاً هم اشاره شد، بیان مارکرها در تحقیقات محققان مختلف، اختلافات قابل توجهی را نشان می‌دهند که دلیل آن اساساً به خاطر تفاوت در منبع بافتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، روش‌های تفکیک و توسعه، تعداد پاساژ، سن و جنس فرد اهدا کننده سلول است؛ برای مثال مارکرهای CD45 و CD14 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی میان اهدا کنندگان کودک و مسن چهار برابر تفاوت بیان را نشان می‌دهند، که البته هنوز شواهد کافی برای اثبات این حقیقت وجود ندارد.

هنوز مشخص نیست که تکنیک‌های تفکیک چگونه بر روی بیان مارکرهای مختلف تأثیر می‌گذارند، اما مشخص گشته است که دستکاری‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان کم یا زیاد مارکرهای مختلف تأثیر گذار هستند. سن و تعداد پاساژسلول‌های بنیادی مزانشیمی، ملاحظات مهمی در رابطه با ویژگی‌های این سلول‌ها می‌باشند. نشان داده شده که سلول‌های بنیادی مزانشیمی که رو به پیری است مقادیر نرمالی از CD105، CD90، CD44، CD29 و CD166 را علیرغم ظرفیت تمایزی کاهش یافته بیان می‌کنند. به علاوه، کشت طولانی می‌تواند منجر به کاهش بیان مارکرهای خاصی شود که دلایل آن سن، چسبندگی به پلاستیک، اتصالات سلولی، مواجهه با فاکتورهای اگزوزنیک هم چون سرم جنینی گاو^{۳۵} (FBS) مورد استفاده در محیط کشت و دستکاری‌های آنزیمی مورد استفاده در هنگام پاساژ مانند استفاده از تریپسین جهت جداسازی پروتئولیتیک سلول‌ها از محیط کشت و ایجاد سوسپانسیون سلولی، هستند (۱۴۷).

۱-۳-۷ محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

توجه زیادی به محیط‌های کشت مختلف و فاکتورهای مورد استفاده برای رشد و توسعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی که قادرند بر پتانسیل بیان و تمایز مارکرهای سطحی این سلول‌ها تأثیر بگذارند، متمرکز نشده است. تا به امروز هیچ محیط کشت خاصی جهت رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی تعیین نشده است و در مطالعات مختلف از محیط کشت‌ها و فاکتورهای متفاوتی استفاده شده است. معمولاً از محیط کشت‌های زیر که با موادی هم چون FBS، سرم انسانی، عصاره پلاکت، گلوکز کم یا زیاد، آمینواسیدهای اضافی مانند ال‌گلوتامین،

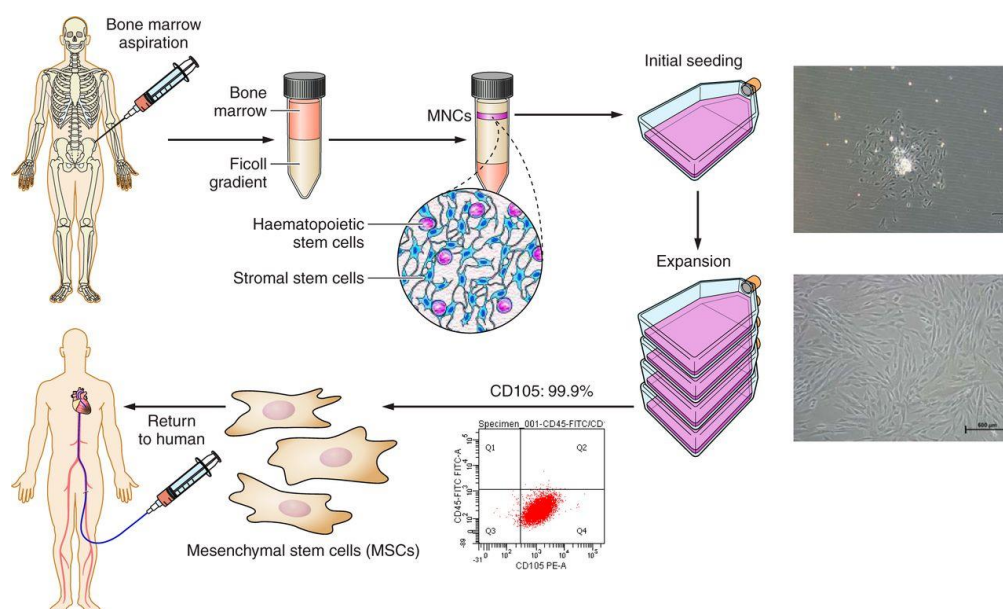
^{۳۵} Fetal bovine serum

داکسی‌ریبونوکلوئیدها، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و بسیاری فاکتورهای دیگر غنی‌سازی می‌شوند، در تحقیقات سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود:

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

Eagle's minimum essential medium (MEM)

امروزه معتقدند که گستردگی محیط کشت، تنها بر پتانسیل تکثیر تأثیر دارد، اما ممکن است تأثیرات محیط کشت‌های مختلف، فراتر از فقط تعداد تقسیم سلولی باشد (۱۴۷).



شکل ۱-۹. کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی

۸-۳-۱ کاربردهای درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

خصوصیات منحصر به فرد MSCها همچون چندتوانی، منبع قابل دسترس، جداسازی آسان، تکثیر سریع آن‌ها در محیط کشت، توانایی مهاجرت به بافت‌های آسیب‌دیده و القا یا تسهیل تمایز سلولی در پاسخ به سیگنال‌های محیطی باعث شده است تا از آن‌ها در درمان و مهندسی

بافت استفاده گردد. از MSCهای مشتق شده از مغز استخوان در طیف وسیعی از درمان‌ها که شامل ترمیم قلبی-عروقی، درمان فیبروز ریه، ترمیم غضروف و استخوان و طناب نخاعی آسیب دیده می‌باشد، استفاده شده است. به منظور استفاده موفقیت آمیز از این سلول‌ها در درمان بیماری‌ها، لازم است که این سلول‌ها به درستی جدا شوند، به تعداد کافی تکثیر یابند و خصوصیات خود را بعد از تکثیر در محیط *in vivo* حفظ کنند (۱۳۶، ۱۴۸).

مطالعات اخیر نشان دادند که علاوه بر عملکرد خود MSCها، فاکتورها و مواد فعال تولید شده و رها شده توسط MSCها نیز دارای اثرات حمایتی و درمانی هستند. MSCها توانایی ترشح تعداد زیادی میکرووزیکول^{۳۶} دارند. میکرووزیکول‌ها (MVs) میانجی‌گرهای مهمی برای ارتباط سلول‌ها با یکدیگر محسوب می‌شوند و علت ارجحیت استفاده از میکرووزیکول‌های MSC در پروتکل‌های درمانی نسبت به استفاده از خود MSCها، این است که MVها بدون ریسک تمایز MSC به استرومال فیبروبلاست که به نفع رشد تومور است، می‌توانند از چرخه سلولی جلوگیری کنند. و در مقایسه با MSCها، MVها نه تنها نقش اساسی و مهم در بازسازی و ترمیم بافت دارند بلکه بادوام‌ترند و اثرات حمایتی قوی‌تری را القا می‌کنند. همچنین به دلیل اندازه کوچکشان در مقایسه با MSCها، تزریق سیستماتیک MVها، نگرانی‌های ایمنی را مانند انسداد عروق که در رابطه با MSCها دیده می‌شود کاهش می‌دهند (۱۵۲-۱۴۹).

^{۳۶} Microvesicle

۱-۴ اهداف تحقیق:

۱-۴-۱ هدف اصلی این تحقیق:

تعیین اثر پاروویروس B19 بر بیان ژن‌های سایتوکاین‌های التهابی IL-6، IL-1 β ، TNF- α و ژن NF- κ B در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط آزمایشگاهی

۱-۴-۲ اهداف فرعی این مطالعه:

۱- انتقال ژن پلاسמיד حاوی ژنوم ویروس به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

۱-۴-۳ اهداف کاربردی این مطالعه:

بررسی پاتوژنز پاروویروس B19 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به عنوان اصلی‌ترین سلول حمایت‌کننده‌ی آشیانه‌ی سلول‌های بنیادی خون‌ساز مغز استخوان (HSCs) و ارزیابی پروفایل بیان ژن‌های التهابی سلول‌های آلوده شده با ویروس، می‌تواند ما را در شناخت بهتر آسیب‌شناسی بیماری‌های مغز استخوان، خصوصاً لوسمی‌ها کمک کند. ۵

۱-۵ فرضیه‌ها سؤال‌های پژوهش:

- ۱- پاروویروس B19 می‌تواند سبب افزایش بیان ژن التهابی IL-6 گردد.
- ۲- پاروویروس B19 می‌تواند سبب افزایش بیان ژن التهابی IL-1 β گردد.
- ۳- پاروویروس B19 می‌تواند سبب افزایش بیان ژن التهابی TNF- α گردد.
- ۴- پاروویروس B19 می‌تواند سبب افزایش بیان ژن التهابی NF- κ B گردد.

فصل ۲

مروری بر مطالعات انجام شده

۲-۱ مروری بر مطالعات انجام شده در ارتباط سرطان و التهاب مزمن:

بعد از تحقیقات پیشگامانه آقای ویرچاو در بیش از ۱۵۰ سال پیش، فرضیه وی مبنی بر ارتباط التهاب مزمن و توموزایی به خصوص در دو دهه اخیر توسط محققان زیادی به اثبات رسیده است.

در سال ۲۰۱۰، Sergei I. Grivennikov و همکاران در ایالات متحده، تحت مقاله‌ای به طور اکید عنوان داشتند که التهاب می‌تواند در تمام مراحل سرطان یعنی شکل‌گیری، نمو تومور، گسترش، تهاجم و متاستاز نقش ایفا کند و از این رو عنوان داشتند که به دلایل متعدد پیشگیری بهتر از درمان خواهد بود (۲).

در سال ۲۰۱۰، Aaron J. Schetter و همکاران در دانمارک، به اثبات ارتباط التهاب و سرطان و در ارتباط بودن مسیرهای microRNA، رادیکال‌های آزاد، سایتوکاین‌ها و p53 پرداختند (۱۵۴).

در مقاله مروری Yihui Fan و همکاران در سال ۲۰۱۲ در آمریکا نیز آمده که مسیرهای پیام‌رسان NF- κ B و STAT3 با همکاری هم التهاب را به سرطان متصل می‌کنند (۱۵۵).

در سال ۲۰۱۳، Sarah Shigdara و همکاران در استرالیا به ارتباط التهاب و سلول‌های بنیادی سرطانی و مکانیسم‌های ملکولی آن‌ها و همچنین مهاجرت سلول‌های بنیادی به آشیانه دیگر پرداختند و عنوان کردند این سلول‌های بنیادی با به کار انداختن مسیرهای مختلف مانند IL-6، NF- κ B و غیره باعث التهابی شدن ریزمحیط تومور می‌شوند (۱۵۶).

در سال ۲۰۱۳، Yongzhong Wu و همکاران در آمریکا، مکانیسم‌های ملکولی سرطان‌های وابسته به التهاب مزمن را تشریح کردند و ضمن اشاره به نقش‌های اساسی سایتوکاین‌ها،

فاکتورهای رشد و آنزیم‌های مولد ROS در تمام مراحل تومورزایی، بیان داشتند که هر کدام از این موارد می‌تواند فاکتور هدفی جهت درمان سرطان باشد (۱۵۷). در همین سال نیز Lisa M. Coussens و همکاران در آمریکا به خنثی کردن التهاب مزمن عامل تومورزایی به عنوان یک گلوله جادویی علیه سرطان اشاره کردند (۱۵۸).

در سال ۲۰۱۴، Glauben Landskron و همکاران در شیلی، نقش گسترده سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل $TNF-\alpha$ و IL-6 و همچنین ضد التهابی نظیر IL-10 در ریزمحیط تومور و ارتباطات این سایتوکاین‌ها را در شکل‌گیری و پیشروی سرطان به خوبی شرح دادند و نشان دادند یکی از راه‌های ایجاد تومور توسط این سایتوکاین‌ها، ایجاد رادیکال‌های آزاد در پروسه التهاب مزمن است (۳).

در سال ۲۰۱۴، Koji Taniguchi و همکارانش در آمریکا، نقش اساسی IL-6 و سایتوکاین‌های مرتبط با آن مانند IL-11، IL-27 و IL-31 را به عنوان یک پل ارتباطی مهم بین التهاب و سرطان بیان داشتند. آن‌ها نشان دادند این سایتوکاین‌ها با اعمال تأثیر مستقیم بر روی سلول‌های بدخیم، ریزمحیطی را به وجود می‌آورند که باعث گسترش تومور می‌گردد. در ادامه، آن‌ها جهت درمان، داروهایی را پیشنهاد می‌دهند که این فعالیت این سایتوکاین‌ها را متوقف سازند (۴).

در سال ۲۰۱۴، Maximilian J. Waldner و همکاران در آلمان، به اثبات نقش بنیادی IL-6 در التهاب مزمن و توسعه تومور بافت‌های مختلف از جمله روده‌ای پرداختند (۱۵۹).

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ توسط Shanthini M. و همکاران در انگلستان انجام گرفت، مجدد ضمن تأکید بر موضوع ارتباط التهاب با تومورزایی، درمان در مراحل اولیه سرطان با تمرکز بر بیومارک‌های التهابی پیشنهاد داده شد (۹).

۱-۱-۲ مروری بر مطالعات انجام شده بر روی ارتباط آلودگی‌های میکروبی با

التهاب و سرطان:

کشف عامل میکروبی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بشر یعنی زخم لوله گوارشی^{۳۷} که با التهاب مزمن ایجاد می‌شود، تحقیقات را در ارتباط با تأثیر میکروب‌ها بر پیدایش شرایط التهاب مزمن برانگیخت.

Michael Karin و همکاران، در سال ۲۰۰۶ در آمریکا به بیان ارتباط آلودگی‌های میکروبی و سرطان از طریق ایجاد التهاب مزمن پرداختند و به طور خلاصه نشان دادند که چگونه عملکرد نامناسب سیستم ایمنی در مقابله با آلودگی‌های میکروبی سبب پیشرفت بیماری می‌گردد (۱۶۰).

در ادامه ارتباط عوامل میکروبی خصوصاً ویروسی و التهاب مزمن، در سال ۲۰۰۷، Alvin TC Lee و همکاران در سنگاپور، به بیان ایجاد التهاب مزمن توسط HBV و گسترش کارسینوم هپاتوسلولار (HCC) پرداختند (۲۵). در همین سال در سوئد، E Klein و همکاران به ارتباط بین EBV و سیستم ایمنی و اثرات مخرب آن در تولید سایتوکاین‌های مختلف و احتمال بروز بیماری‌های خونی پرداختند (۲۳).

Catherine de Martel و همکاران، در سال ۲۰۰۹ در فرانسه طی مقاله‌ای ارتباط ویروس‌های *H. pylory*^{۳۸}، HPV^{۳۹}، HBV^{۴۰}، HCV^{۴۱}، EBV^{۴۲}، HHV-8^{۴۳} و HTLV-1^{۴۴} با سرطان‌های

^{۳۷} Peptic ulcer disease

^{۳۸} Human papilloma virus

^{۳۹} Hepatitis B virus

^{۴۰} Hepatitis C virus

مختلف را به طور مبسوط تشریح کردند. مشارکت ویروس HBV و HCV در سرطان‌های هپاتوسلولار حدود ۸۰٪، ویروس EBV در لنفوم هوجکین ۳۰٪ و ویروس HPV در بیش از ۹۵٪ سرطان‌های سرویکس می‌باشد (۳۷، ۱۳).

۲-۱-۲ مروری بر مطالعات انجام شده در ارتباط با عفونت پاروویروس B19:

علاوه بر ویروس‌های اشاره شده که نقش آن‌ها در تومورزایی به خوبی نشان داده شده است، پاروویروس B19 نیز در چندین مطالعه، رابطه‌ی تنگاتنگی را با سرطان‌های خون از خود نشان داده است. هر چند که هنوز سرطان‌زایی آن به اثبات نرسیده ولی مطالعات، حاکی از احتمال بالای دخالت ویروس در لوسمی‌ها دارد.

Vasconcelo و همکاران، وجود عفونت ویروسی را با تغییر اپی‌ژنتیکی متیلاسیون در لوسمی‌های حاد ارتباط داده‌اند (۲۷).

Ibrahim و همکاران نیز ارتباط بین عفونت با این ویروس و لوسمی‌های حاد را مطرح نموده‌اند (۲۸). ارتباط ذکر شده در گزارش Jitschin و همکاران نیز مشاهده می‌شود (۲۹). همچنین، رابطه‌ی معنادار بین عفونت با پاروویروس B19 و لوسمی حاد در تحقیقات Alba و همکاران در سال ۲۰۰۶ و دو مطالعه‌ی جداگانه‌ی Yetgin و همکاران (۲۰۰۰ و ۲۰۰۴) نشان داده شده است (۳۰-۳۲).

۴۱ Epstein-varr virus

۴۲ Human herpes virus 8

۴۳ Human T-cell leukemia virus type I

در مطالعه‌ی Fritch Lilla و همکاران در سال ۲۰۱۵ وجود تیترا بالایی از ویروس در بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد مشخص شده است (۲۶).

پاروویروس B19 به طور شاخص تمایل به آلوده کردن سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی دارد اما به وضوح نشان داده شده است که این ویروس می‌تواند به طیف وسیعی از انواع سلول‌ها وارد شده و در آن‌های عفونت پایدار ایجاد کند.

جالب است که در سال ۱۹۹۷، P. Cassinotti و همکاران در سوئیس، نشان دادند که DNA پاروویروس B19 می‌تواند در محیط مغز استخوان افراد سالم پایدار بماند بدون این که هیچ نشانه‌های در این افراد دیده شود (۱۶۱).

در سال ۲۰۰۸، طی مقاله‌ای Mikael Sundin و همکاران در سوئد، ایجاد عفونت پایدار B19V در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان به موجب بیان آنتی ژن P یا همان گلوبوساید، به اثبات رساندند (۱۶۲).

Laura A و همکاران در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه ایالت فلوریدا با روش‌های مختلف ملکولی نشان دادند که B19V ویروس می‌تواند به طیف وسیعی از سلول‌های غیراریتروئیدی وارد شده و عفونت پایدار ایجاد کند (۱۵۳).

شکل ۱-۲ بیماران تحت درمان پیوند سلول‌های بنیادی که MSC های آلوده به B19V را جهت درمان GVHD دریافت کردند.

| | | |
|---|----------------------------|--------------------------------------|
| Patient | | |
| Unique patient number | I044 | I082 |
| Sex/age, years | Male/60 | Female/65 |
| Diagnosis | Myeloma | Chronic lymphocytic leukemia |
| H SCT | | |
| HLA match | HLA-identical sibling | HLA-identical sibling |
| Conditioning | RIC: Flu + TBI | RIC: Flu + Cy |
| Cell source | PBSC | PBSC |
| GVHD prophylaxis | CsA + MMF | CsA + MTX |
| Day of GVHD diagnosis | 51 | 25 |
| Grade of acute GVHD | III | III |
| MSC transplantation | | |
| Indication | GVHD | GVHD |
| HLA match | MM | MM |
| Day of first MSC infusion | 77 | 32 |
| Number of MSC infusions | 1 | 3* |
| MSC passage | 2 | 2+3/3/2+3 |
| MSC dose, $\times 10^6/\text{kg}$ | 0.9 | 1.7/1.7/0.9 |
| GVHD response to MSC infusion | CR | PR |
| B19 investigations and symptoms | | |
| HSC donor anti-parvovirus B19 IgG serology | + | - |
| HSC donor serum load of parvovirus B19 DNA, $\times 10^3 \text{ geq/mL}$ | - | - |
| Recipient anti-parvovirus B19 IgG serology, pretreatment | - | + |
| Recipient anti-parvovirus B19 IgG serology, 1 month posttreatment | - | - |
| Recipient anti-parvovirus B19 IgG serology, 3 months posttreatment | - | - |
| Recipient serum load of parvovirus B19 DNA, $\times 10^3 \text{ geq/mL}$, pretreatment | - | - |
| Recipient serum load of parvovirus B19 DNA, $\times 10^3 \text{ geq/mL}$, 1 month posttreatment | - | - |
| Recipient serum load of parvovirus B19 DNA, $\times 10^3 \text{ geq/mL}$, 3 months posttreatment | - | - |
| Clinical symptoms of parvovirus B19 disease | None | None |
| Recipient immunocompetence at MSC transplantation | | |
| Lymphocyte proliferation in allogeneic MLC, % of positive control | 22% | 14% |
| IgG level, g/L (reference interval, 6.1 to 14.9) | 3.4 | 5.1 |
| IgA level, g/L (reference interval, 0.88 to 4.5) | 0.41 | 0.91 |
| IgM level, g/L (reference interval, 0.27 to 2.10) | 0.49 | 0.34 |
| White blood cell count, $\times 10^9/\text{L}$ (reference interval, 3.5 to 8.8) | 8.7 | 1.8 |
| Absolute neutrophil count, $\times 10^9/\text{L}$ (reference interval, 1.6 to 7.5) | 7.6 | 0.8 |
| Blood parameters† | | |
| Hemoglobin, g/L (reference interval: females, 117 to 153; males, 134 to 170) | 95/90/85 | 114/117/124 |
| White blood cell count, $\times 10^9/\text{L}$ (reference interval, 3.5 to 8.8) | 8.7/5.4/5.0 | 1.8/9.1/9.9 |
| Platelet count, $\times 10^9/\text{L}$ (reference interval: females, 165 to 387; males, 145 to 348) | 104/119/78 | 55/96/92 |
| Outcome | Deceased, relapse, day 773 | Deceased, septicemia, fungi, day 120 |

فصل ۳

مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد و وسایل

۳-۱-۱ مواد:

| | |
|----------------|--|
| Thermofisher | سرم جنین گاوی |
| DMEM (Bioidea) | محیط کشت |
| Thermofisher | آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی سیلین |
| Thermofisher | تریپسین / EDTA |
| Milli-Q | آب مقطر دیونیزه |
| Sigma | دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) |
| Gibco | قرص فسفات‌بافر سالین (PBS) |
| GE Healthcare | فایکول (Ficoll) |
| Ebioscience | آنتی‌بادی علیه CD73، CD105، CD166، CD90 و CD45 |
| Merck | متانول، اتانول، اسیدکلریدریک و کلروفرم |
| Sigma | تریپان بلو ۰/۴ درصد |
| Sigma | آگارز |
| Sigma | بافر تریس TRIS |
| Merck | ایزوپروپانول |
| Thermofisher | باکتری مستعد DH5α |
| Sigma | آمپی سیلین |
| Thermofisher | محیط کشت تمایزی چربی |
| Thermofisher | محیط کشت تمایزی استخوانی |

| | |
|--------------|--|
| Sigma | رنگ Oil Red و Alizarin Red |
| Ampliqon | مسترمیکس qPCR |
| Cinnaclon | مسترمیکس PCR |
| Thermofisher | لدر DNA (DNA Ladder) |
| Thermofisher | بافر لودینگ (Loading Buffer) |
| Macrogen | پرایمرها |
| Lonza | وکتور حاوی GFP (Green Fluorescent Protein) |
| | کیت‌های مورد استفاده |
| MN | کیت استخراج پلاسمید |
| Lonza | کیت انتقال ژن نوکلئوفکتور |
| QIAGEN | کیت استخراج RNA |
| Takara | کیت سنتز cDNA |

۳-۱-۲ وسایل آزمایشگاهی مورد نیاز

ظروف مخصوص کشت سلول در اندازه‌های مختلف شامل

SPL فلاسک‌ها و پلیت ۲۴ و ۱۲ خانه و لوله فالكون ۵۰ و ۱۵ میلی‌لیتری

Eppendorf کویت

Nikon میکروسکوپ اینورت فلورسنت

Motic میکروسکوپ نوری

| | |
|---------------|--|
| ABI | دستگاه فلوسیتومتری |
| Lonza | دستگاه نوکلئوفکتور |
| ABI | دستگاه Real-time PCR |
| Eppendorf | بایوفوتومتر |
| Jal Tajhiz | هود بیولوژیک |
| New bronswich | یخچال و فریزرهای ۲۰- و ۸۰- درجه سانتیگراد |
| Zaeim-teb | اتوکلاو |
| Memmert | انکوباتور CO2 دار |
| Pars Azma | انکوباتور Shaker |
| KISKED | ترموبلاک |
| Sartorius | ترازوی حساس و معمولی |
| Eppendorf | سمپلر متغیر (۰/۲ تا ۲، ۲ تا ۲۰، ۲۰ تا ۱۰۰ و ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مایکرولیتر) |
| Kiagen | ورتنکس و اسپینر |
| Greiner | لوله اپندورف ۰/۵ و ۱/۵ میلی لیتر |
| SPL | کرایوتیوب |
| MVE | تانک ازت |
| Eppendorf | سانتریفوژ معمولی و یخچال دار و میکروپیوژ |
| Eppendorf | دستگاه PCR |
| Akhtarian | سیستم الکتروفورز |
| Sabz | سیستم Gel Documentation |

| | |
|----------|-----------------------------------|
| Zimax | شیشه آلات |
| SPL | پیپت |
| BOECO | سر سمپلر (آبی، زرد و کریستالی) |
| Iran | چسب اتوکلاو |
| Malaysia | دستکش لاتکس یک بار مصرف |
| Iran | گاز غیر استریل |
| Orange | میکروتیوب ۰/۵، ۱/۵ و ۲ میلی لیتری |

۲-۳ روش‌ها

۱-۲-۳ روش تهیه بافرها و معرف‌ها

۱-۲-۳-۱ روش تهیه بافر PBS

محلول PBS به علت هم‌غلظت و هم‌نوع بودن با مواد بیولوژیکی بدن و نیز غیرسمی بودن آن برای سلول در رقیق کردن مواد و شستن ظروف محیط کشت کاربرد دارد. بافر^{۴۴} PBS، به صورت قرص‌هایی موجود می‌باشد که با حل کردن هر کدام از آن‌ها در ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه، محلول ۱X با $PH=7.4$ به دست می‌آید.

^{۴۴} Phosphate buffer saline

۳-۲-۱-۲ روش تهیه گلیسرول ۶۰٪

این محلول در نگهداری باکتری‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد کاربرد دارد. گلیسرول خالص را با آب مقطر به نسبت به ۴۰ به ۶۰ مخلوط، سپس اتوکلاو می‌کنیم. این گلیسرول در دمای اتاق قابل نگهداری می‌باشد.

۳-۲-۱-۳ طرز تهیه استوک آمپی سیلین

از آمپی سیلین در کلونینگ جهت انتخاب وکتور مورد نظر که در اینجا حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است استفاده می‌نماییم. آمپی سیلین در غلظت اولیه ۱۰۰ mg/ml با آب مقطر تهیه شده و سپس با فیلتر ۰/۲۲ μm فیلتر و در ۲۰- درجه سانتیگراد فریز می‌گردد. از آنجایی که غلظت نهایی در محیط کشت باید ۱۰۰ mg/ml باشد کافیست در هنگام تهیه محیط LB^{۴۵} آگار مایع، آنتی‌بیوتیک با نسبت ۱ به ۱۰۰۰ به آن اضافه شود.

۳-۲-۲-۲ محیط کشت‌های مورد استفاده

۳-۲-۲-۳-۱ روش تهیه محیط کشت LB مایع

| | | |
|-----------------|--|----------------|
| پپتون | | ۱۰ گرم |
| Yeast extract | | ۵ گرم |
| NaCl | | ۱۰ گرم |
| DW (آب دیونیزه) | | ۱۰۰۰ میلی‌لیتر |

این محیط، پس از اتوکلاو در یخچال نگهداری می‌شود

^{۴۵} Luria broth

۳-۲-۲-۲ روش تهیه محیط کشت تمایزی استئوبلاستی

برای تهیه محیط تمایز استئوبلاستی از محیط کشت عمومی DMEM، L-گلوتامین و FBS ۱۰٪ استفاده شد که به این محیط کشت، فاکتورهای دگزامتازون با غلظت نهایی ۰/۱ میلی مولار، بتاگلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار و آسکوربات-۲-فسفات با غلظت نهایی ۰/۲ میلی مولار بر میلی لیتر اضافه گردید.

۳-۲-۲-۳ روش تهیه محیط کشت تمایزی ادیوسایتی

محیط آدیپوژنیک شامل محیط DMEM به علاوه اسکورییک اسید با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، دگزامتازون با غلظت ۷ تا ۱۰ مولار، ایندومتاسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر و FBS ۱۰ درصد بود.

۳-۳ مراحل انجام پژوهش

این مطالعه به صورت *invitro* بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان انجام شد. لازم به ذکر است مطالعه از نوع بنیادی-کاربردی می‌باشد. مراحل کار به صورت خلاصه در شکل ۱-۳ خلاصه شده است:

- 1 جداسازی سلول‌های بنیادی تک‌هسته‌ای مغز استخوان و تأیید مزانشیمی بودن آن‌ها توسط تست‌های تشخیصی مختلف
- 2 ترنسفورماسیون پلاسمید حاوی ژنوم پاروویروس B19 به باکتری DH5α و تکثیر و تخلیص پلاسمید
- 3 انتقال پلاسمید حاوی ژنوم پاروویروس B19 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان توسط نوکلئوفکشن
- 4 ارزیابی و تأیید انتقال پلاسمید به داخل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان
- 5 بررسی بیان کمی ژن‌های دخیل در التهاب مورد مطالعه در سلول‌های آلوده شده با ویروس توسط real-time PCR

شکل ۱-۳. مراحل انجام پژوهش به صورت خلاصه

۳-۳-۱ جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان و تأیید آن‌ها

۳-۳-۱-۱ جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سه نمونه مغز استخوان سالم، جداسازی شده و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در این تحقیق، آسپیراسیون مغزاستخوان افرادی بودند که تشخیص بیماری‌های مرتبط با مغزاستخوان برای آن‌ها داده شده و پس از بررسی، نرمال، تشخیص داده شده بودند. سلول‌های تک‌هسته‌ای از طریق شیب غلظتی با استفاده از محلول فایکول جدا گردید برای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای، مغزاستخوان، رقیق گشته و با نسبت یک به سه

(فایکول:خون) روی فایکول برده شد. برای این کار از محلول فایکول با دانسیته‌ی ۱/۰۷۷ استفاده گشت. بدین منظور بعد از رقیق کردن محلول آسپیره به نسبت ۱:۱ با PBS، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۵۰G سانتریفیوژ شد.

سلول‌های تک‌هسته‌ای دارای چگالی کمتری نسبت به فایکول هستند، لذا بر روی آن قرار گرفته و گلبول‌های قرمز باقی مانده که دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به فایکول بودند در ته لوله رسوب کردند. سپس مایع رویی که حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای بود برداشت و با دور ۳۰۰G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت 1×10^6 از سلول‌های تک‌هسته‌ای بر سانتی‌متر مکعب به فلاسک‌های T75 انتقال داده شد. فلاسک‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 نگه‌داری و هفته‌ای سه بار تعویض محیط شدند. جهت تکثیر سلول‌ها از محیط DMEM با FBS ۱۰ درصد استفاده شد. کلونی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بعد از یک هفته قابل مشاهده بودند. سلول‌ها تا پاساژ سوم، تکثیر شده و سپس مورد ارزیابی فلوسایتومتری و سایر آزمایشات قرار گرفتند.

۲-۳-۳- شمارش سلول‌ها و تعیین درصد سلول‌های زنده

برای شمارش سلول‌ها از لام نئوبار استفاده گردید. برای این منظور حدود ۵۰ مایکرولیتر (لاندا) از سوسپانسیون سلول، برداشته با هم‌حجم خود تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شد. بلافاصله ۱۵ مایکرولیتر از آن روی لام نئوبار قرار داده شده و سلول‌های موجود در ۴ مربع بزرگ در گوشه‌ها شمارش شد و سپس مجموع، بر ۴ تقسیم و در 10^4 ضرب شد. لازم به ذکر است که سلول‌های سالم، غشاء دست‌نخورده و سالمی دارند، رنگ نمی‌گیرند و شفافند؛ در حالی که سلول‌های مرده به رنگ آبی در می‌آیند.

۳-۳-۱-۳ فلوسایتومتری

پس از کشت و پاساژ سلول‌های جدا شده، جهت تعیین هویت از فلوسایتومتری توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی CD73، CD105، CD90 و CD45 استفاده شد و وجود آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آن‌ها تأیید گردید.

ابتدا محیط رویی تخلیه شده و بعد از آن سلول‌های چسبنده، تریپسینه شدند، سپس محتویات آن با پیپت پاستور در پنج لوله اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتر قرار گرفت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر محلول PBS به آن اضافه شد. سپس به هر کدام از آن‌ها ۷ میکرولیتر از یکی از آنتی‌بادی‌های CD73-FITC، CD105-FITC، CD90-FITC و CD45-FITC اضافه شد و در دمای یخچال به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. در ادامه به آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول پارافرم‌آلدهید ۱٪ اضافه شد. جهت نمونه کنترل به جای آنتی‌بادی CD-FITC، از محلول ایزوتایپ کنترل (Mouse IgG1) استفاده گردید. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری BD آنالیز شد.

۳-۳-۲ تمایز سلول‌های تک هسته‌ای به سلول‌های استئوبلاست و تأیید تمایز

۳-۳-۲-۱ القای تمایز استئوبلاستی در سلول‌های تک هسته‌ای

تمایز استئوبلاستی سلول‌های تک‌هسته‌ای MNC، جهت تأیید MSC انجام شد. بدین منظور محیط کشت رویی به طور کامل تخلیه گردید و به هر چاهک ۱ سی‌سی محیط تمایزی استئوبلاستی اضافه شد. تعویض محیط کشت ۲ بار و به مدت ۹ روز انجام شد. سلول‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند که و شرایطشان پایدار بود و چندین مرتبه در طول دوره، جهت

مشخص شدن روند تمایز از سلول‌ها عکس گرفته شد. روز ۹ رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد بر روی سلول‌ها انجام گرفت.

۳-۳-۲-۲ رنگ‌آمیزی Alzarin-Red-S

برای تأیید تمایز استئوبلاستی از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد استفاده گردید. آلیزارین‌رد رنگ افتراقی است که با اتصال به رسوبات کلسیمی، ماتریکس کلسیفیه شده را به رنگ قرمز مبدل می‌کند. برای این منظور محیط کشت، تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. سپس با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند و با آب مقطر شستشو انجام گرفت. نهایتاً رنگ آلیزارین‌رد ۱ درصد اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه به دور از نور و در دمای اتاق، انکوبه شدند. در ادامه با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تمایز سلول‌های تک هسته‌ای به سلول‌های ادیپوسایتی و تأیید تمایز

۳-۳-۲-۳ القای تمایز ادیپوسایتی

تمایز ادیپوسایتی سلول‌های تک هسته‌ای، نیز جهت تأیید MSCها انجام شد. بدین منظور محیط کشت رویی به طور کامل تخلیه گردید و به هر چاهک ۱ سی‌سی محیط تمایزی ادیپوسایتی اضافه شد. تعویض محیط کشت ۲ بار در ۹ روز انجام پذیرفت. در این مورد نیز سلول‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند که وضعیتشان رضایت‌بخش بود. چندین مرتبه در طول دوره، جهت مشخص شدن روند تمایز از سلول‌ها عکس گرفته شد. روز ۹، رنگ‌آمیزی Oil-RED-O بر روی سلول‌ها انجام گرفت.

۴-۲-۳ رنگ آمیزی OIL-RED-O

برای تأیید تمایز ادیپوساییتی از رنگ آمیزی OIL-RED-O استفاده گردید. رنگ OIL-RED-O با اتصال به قطرات چربی تشکیل شده در نتیجه تمایز، آن‌ها را به رنگ قرمز در می‌آورد. برای این منظور محیط کشت، تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو شدند و با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت گردیدند و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. در ادامه ۱ سی‌سی ایزوپروپانول ۶۰٪ به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از آن، ایزوپروپانول، خارج و رنگ به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس مجدد با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود وزیکول‌های چربی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۵-۲-۳ فریز کردن سلول

از آن‌جا که احتمال آلودگی و از دست دادن سلول‌ها وجود داشت تعدادی از آن‌ها به عنوان ذخیره، فریز گردید. قبل از فریز سلول‌ها باید شمارش و بررسی *viability* انجام می‌گرفت. جهت فریز سلول‌ها باید در نظر داشت که در هر کرایویال کمتر از ۱۰۰ هزار سلول فریز نگردد.

۱- ابتدا کل محیط رویی فلاسک T75 خارج و فلاسک ۲ بار با محلول PBS شسته شد.

۲- مقدار ۳ سی‌سی محلول Tripsin/EDTA اضافه گردید و پس از کنده‌شدن سلول‌ها شمارش انجام شد.

۳- مقدار ۹ سی‌سی محیط کشت حاوی FBS اضافه گردید تا اثر تریپسین خنثی گردد.

۴- کل محتویات فلاسک به یک عدد لوله فالكون منتقل گردید و برای مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰G سانتریفیوژ گردید تا پلت انتهایی شکل گیرد.

۵- کل محیط رویی خارج گردید و به پلت انتهایی FBS/DMSO (۹۰٪ / ۱۰٪) اضافه گردید.

۶- پس از این که مواد پیپتاژ شدند، مقدار ۱۰۰۰ مایکرولیتر به هر کرایوتیوب که از قبل، مشخصات سلولی بر روی آن نوشته شده اضافه کردیم.

۷- بلافاصله کرایوتیوب‌ها به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل گردید و پس از ۲۴ ساعت به تانک ازت منتقل شدند.

۶-۲-۳-۳ دفریز کردن سلول‌ها

۱- محیط کشت حاوی FBS، داخل فلاسک ریخته شد تا محیط کشت به دمای محیط برسد.

۲- کرایوتیوب‌ها را با دست، گرما داده تا زمانی که یک تکه یخ هنوز داخل آن بماند، زیرا DMSO برای سلول، سمی است و اگر مدتی گرما ببیند به سلول آسیب می‌رساند.

۳- قطره قطره محیط کشت به سلول‌ها اضافه شد و سپس کل محتویات کرایوتیوب به داخل فلاسک منتقل گردید.

۴- فلاسک را داخل انکوباتور گذاشته و ۲۴ ساعت بعد، تعویض محیط انجام گرفت.

ترنسفورماسیون پلاسمید حاوی ژنوم پاروویروس B19 به باکتری DH5α

پلاسمید pH10 حاوی ژنوم پاروویروس B19 (اهدایی از آقای دکتر گالینا، دانشگاه بولونیا، ایتالیا) گرفته شد. این پلاسمید مشتق از پلاسمید pUC18 می‌باشد که دارای ۷۵۴۰ نوکلئوتید و

حاوی ژنوم پاروویروس B19، استرین (Accession No. AF162273) HV به جز قسمتی از توالی ITR آن می باشد. این وکتور در برگیرنده پروموتور P6 ویروس است.

به منظور تهیه باکتری هایی که قابل استفاده در ترانسفورماسیون با روش الکتروپوریشن^{۴۶} باشند ابتدا باید باکتری ها را آماده سازی و مستعد نموده و در قسمت های کوچکی ذخیره سازی نماییم. جهت تولید باکتری مستعد شوک الکتریکی باید طبق روش زیر عمل نمود:

۱- حدود ۳ میلی لیتر از باکتری DH5α که یک شب در محیط LB مایع رشد کرده را به ۲ لیتر محیط LB مایع استریل اضافه نموده و در ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی شیکر انکوبه می کنیم.

۲- هنگامی که OD به حدود ۰/۴ رسید، باکتری ها را برای مدت ۲۰ دقیقه در ۳۵۰۰G و در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می کنیم.

۳- سوپرناتانت را دور ریخته و آب مقطر ۴ درجه سانتیگراد بر روی آن اضافه می کنیم. سپس سانتریفوژ را مشابه مرحله قبل و با دور ۵۰۰۰G انجام می دهیم.

۴- مجدداً مرحله سوم را تکرار می کنیم.

۵- سوپرناتانت را دور ریخته و بر روی پلت سلولی ۲۰۰ میلی لیتر گلیسرول ۴ درجه سانتیگراد با غلظت ۸/۷٪ می افزاییم.

۶- مجدداً مشابه مرحله ۳ سانتریفوژ را انجام داده و سوپرناتانت را دور ریخته و مجدداً ۵ میلی لیتر گلیسرول، مشابه مرحله قبل به آن اضافه می کنیم و در ویال های فریز، به مقدار ۱۰۰

^{۴۶} Electroporation

مایکرولیتر تقسیم (Aliquot) نموده و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌کنیم.

مراحل الکتروپوریشن به شرح زیر می‌باشد:

۱- باکتری مستعد تهیه شده به روش فوق را از فریزر خارج نموده و بر روی یخ نگهداری می‌کنیم. کووت دستگاه الکتروپوریشن (۲ میلی متری) را هم باید بر روی یخ گذاشت.

۲- ۱۰۰ نانوگرم (۱ تا ۵ مایکرولیتر) از وکتور مد نظر (در این تحقیق، pH10) را به ۱۰۰ مایکرولیتر باکتری اضافه می‌نماییم.

۳- کووت را در داخل دستگاه الکتروپوریتور با تنظیمات ۲۵۰۰ ولت و ۵ میلی‌ثانیه قرار می‌دهیم و برنامه را اجرا می‌کنیم.

۴- یک میلی‌لیتر محیط LB مایع تازه را به باکتری‌های داخل کووت اضافه می‌کنیم و مجموع آن‌ها را از کووت خارج کرده و در یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با شیکر به مدت ۱ ساعت انکوبه می‌کنیم.

۵- حدود ۱۰۰ مایکرولیتر از باکتری‌های الکتروپوریت شده را بر روی پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت می‌دهیم. مابقی باکتری‌ها را در ۳۵۰۰G به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ نموده و به صورت غلیظ، ۱۰۰ مایکرولیتر از آن را در نیمه دیگر پلیت فوق، کشت می‌دهیم.

۳-۳-۳ تکثیر پلاسمید

به منظور تکثیر پلاسمید، باید باکتری DH5 α حاوی ژنوم پاروویروس B19 را تکثیر نمود. جهت این امر از کلونی‌های مثبت ظاهر شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک

آمپی سیلین، کشت LB مایع تهیه گردید و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. همراه با نمونه، یک فالكون حاوی محیط کشت LB مایع فاقد باکتری جهت کنترل در نظر گرفته شد.

۳-۳-۳-۱ فریز باکتری

جهت تهیه استوک از باکتری DH5 α حاوی ژنوم پاروویروس B19 به منظور فعالیت‌های بعدی، باکتری با گلیسرول ۶۰٪ با نسبت ۱:۱ داخل کرایوویال ریخته شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید.

۳-۳-۳-۲ تخلیص پلاسمید

استخراج پلاسمید با استفاده از دستورالعمل جداسازی پلاسمید با تکثیر پایین طبق مراحل زیر انجام شد.

۱- کشت و برداشت سلول‌های باکتریایی: فالكون‌های حاوی محیط کشت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. پلت در انتهای فالكون تشکیل شد و تمام محیط رویی دور ریخته شد.

۲- لیز سلول: ۵۰۰ میکرولیتر بافر A1 اضافه گردید (پیش از آن به بافر A1، RNase اضافه گردید). پس از اضافه شدن، محلول پیپتاژ و ورتکس گردید تا پلت کاملاً حل شود؛ سپس کل محتویات به داخل میکروتیوب منتقل گشت. به دنبال آن ۵۰۰ میکرولیتر بافر A2 اضافه شد و ۶ الی ۸ مرتبه به آرامی وارونه گردید. (از انجام ورتکس به علت احتمال تکه‌تکه شدن DNA ژنومی اجتناب شد). سپس ۵ دقیقه در محیط قرار گرفت. پس از آن ۶۰۰ میکرولیتر بافر A3 به آن اضافه شد و ۶ الی ۸ بار به آرامی وارونه شد.

۳- وضوح لایزت: میکروتیوب به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰G در دمای اتاق سانتیفیوژ شد.

۴- محصور کردن DNA: ستون پلاسمید در داخل لوله جمع‌آوری قرار گرفت و مایع رویی حاصل از سانتیفیوژ داخل ستون ریخته شد. سپس به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰G سانتیفیوژ شد.

۵- شستن غشا سیلیکا: ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW که از پیش به دمای ۵۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود به آن اضافه گردید و به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰G سانتیفیوژ شد. پس از سانتیفیوژ ستون داخل لوله جمع‌آوری جدیدی گذاشته و ۶۰۰ میکرولیتر بافر A4 اضافه شد.

۶- خشک کردن غشا سیلیکا: سانتیفیوژ به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰G انجام شد و لوله‌ی جمع‌کننده دور ریخته شد.

۷- شستن DNA: ستون به داخل میکروتیوب منتقل شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از بافر AE که به دمای ۷۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود به آن اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه میکروتیوب همراه با ستون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد گذاشته و سپس ۱ دقیقه با ۱۱۰۰۰G سانتیفیوژ شد. ستون دور ریخته شد و میکروتیوب حاوی پلاسمید استخراج شده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

پس از تخلیص پلاسمید، محصول واکنش را بر روی ژل آگارز ۱ درصد run کرده و پس از اتمام الکتروفورز، توسط دستگاه gel doc از باندها عکسبرداری شد.

۴-۳-۳ انتقال پلاسمید پاروویروس B19 به سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ترنسفکشن توسط دستگاه نوکلئوفکتور، انجام شد. لازم به ذکر است برای هر دسته از سلول‌ها یک گروه کنترل که شامل وکتور دست نخورده PLEGO-iG2 است نیز ترنسفکت گردید.

مراحل ترنسفکشن به شرح زیر بود:

- ۱- تعداد مناسب از سلول‌های MSC کشت داده شدند.
- ۲- مقدار ۵ میکروگرم DNA برای هر نمونه آماده گردید.
- ۳- محلولهای موجود در کیت به دمای اتاق رسانده شد.
- ۴- پلیت ۲۴ خانهای حاوی محیط DMEM + FBS 10% برای پس از ترنسفکت شدن سلول‌ها آماده و داخل انکوباتور قرار داده شد.
- ۵- محیط رویی سلول‌های کشت شده تخلیه گردید و سلول‌ها با PBS شسته شدند و سپس PBS نیز خارج گردید.
- ۶- مقدار ۳ سی سی محلول Tripsin-EDTA جهت کندن سلول‌ها به فلاسک اضافه شد. پس از اطمینان از کندن سلول‌ها در زیر میکروسکوپ، سه برابر مقدار Tripsin-EDTA (یعنی ۹ سی سی) محیط حاوی FBS اضافه گردید.
- ۷- سلول‌های تریپسینه شده معلق در زیر میکروسکوپ شمرده شدند.
- ۸- ۲ عدد فالكون ۱۵ سی سی برداشته و در هر کدام ۵۰۰/۰۰۰ سلول MSC ریخته شد و سانتریفیوژ بادور ۹۰G در دمای اتاق برای مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سوپرناتانت دور ریخته و پلت سلولی در انتهای فالكون باقی ماند.

۹- پلت سلولی در ۱۰۰ میکرولیتر محلول نوکلئوفکتور حل شد. باید توجه داشت که سلول‌های معلق شده اگر بیش از مدت ۱۵ دقیقه در محلول نوکلئوفکتور بمانند، میزان زنده بودن و اثر ترنسفکشن کاهش می‌یابد.

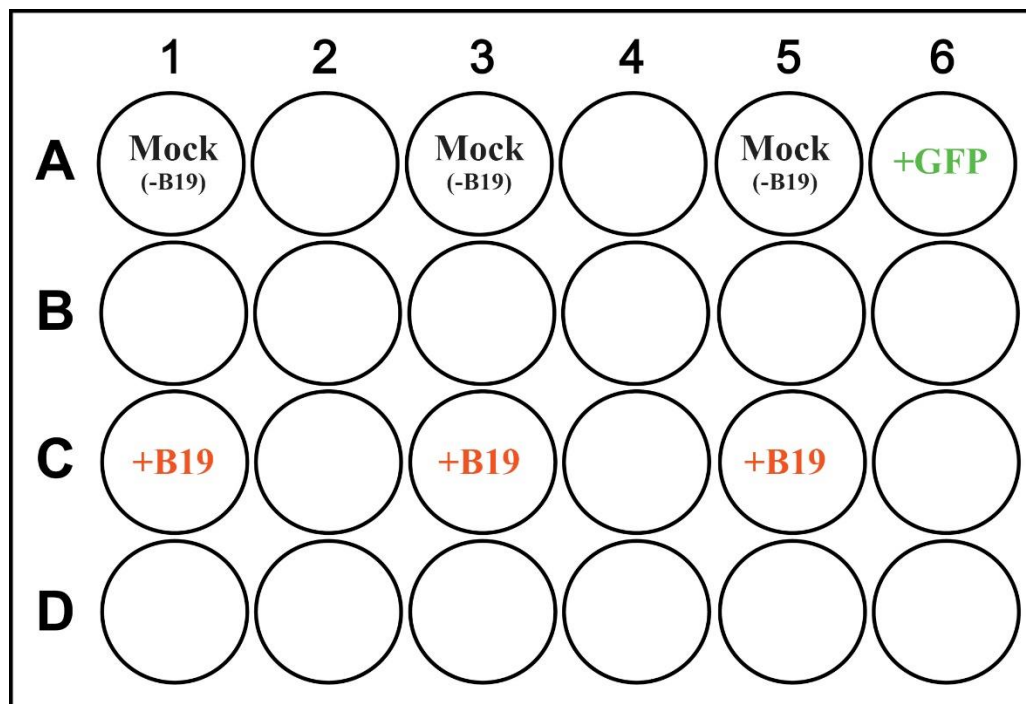
۱۰- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۵ میکروگرم DNA مورد نظر مخلوط شد.

۱۱- نمونه‌ها به داخل کووت‌های مخصوص منتقل شد. از ایجاد هرگونه حباب هوا جلوگیری و سپس در محل مخصوص کووت گذاشته شد.

۱۲- برنامه U23 برای دستگاه نوکلئوفکتور انتخاب و تأیید شد.

۱۳- برای جلوگیری از آسیب به سلول‌ها، بلافاصله پس از اتمام کار دستگاه، کووت از دستگاه خارج و ۵۰۰ میکرولیتر محیط DMEM + FBS 10% به آن اضافه شد. سپس کل محتویات توسط میکروپیپت مخصوص کیت به داخل پلیتی که در مرحله ۴ آماده کرده بودیم انتقال یافت. و به طور مساوی بین گروه‌های مورد نظر تقسیم گردید (شکل ۳-۴).

۱۴- سلول‌ها مطابق شکل ۳-۴ به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و 5% CO2 انتقال داده شدند.



شکل ۳-۲. سلول‌ها، در پلیت ۲۴ خانه و در انکوباتور تحت شرایط استاندارد قرار گرفتند.

۳-۳-۳-۵ ارزیابی انتقال پلاسمید به سلول‌های بنیادی مزانشیمی

جهت تأیید انتقال ژن به سلول و بررسی تعداد سلول‌های ترنسفکت شده از مارکر GFP (که پلاسمیدی حاوی ژن پروتئین فلئورسنت سبز می‌باشد) و ارزیابی آن، ۲۴ ساعت پس از انتقال، توسط میکروسکوپ فلورسنت اینورت استفاده شد. سلول‌های MSC که این پلاسمید را دریافت کرده بودند در زیر میکروسکوپ به صورت نقاط سبز رنگ دیده شدند. همچنین بیان ژن NS1 و کپسید ویروسی توسط RT-PCR تأیید شد. به این منظور از سلول‌های انتقال ژن یافته، mRNA، تخلیص شده و سنتز cDNA صورت گرفت. در این مرحله، RT-PCR کیفی جهت مشاهده محصولات PCR ژن‌های فوق انجام شد. سپس محصولات روی ژل الکتروفورز ۲ درصد ران‌گرایده و توسط دستگاه ژل‌داک از باندها عکس برداری شد.

۴-۳-۳ استخراج RNA

روند استخراج RNA از حساسیت بالایی برخوردار است و باید با دقت انجام شود. به جز ناپایداری شیمیایی بالای RNA در زمان استخراج، RNase های ایجاد شده می توانند باعث تجزیه و از بین رفتن آن شوند. بنابراین قبل از شروع کار، این نکات مورد توجه قرار گرفت:

- استفاده از دستکش و تعویض مرتب آن و کار کردن زیر هود

- استفاده از تیوب های عاری از RNase

- استریلیزاسیون ابزار مورد استفاده در حرارت بالا

از هر دو گروه سلول های ترنسفکت شده اصلی و کنترل به شرح زیر RNA تام استخراج گردید:

به پلت سلولی حاوی 10^6 سلول حجم ۱ میلی لیتر از محلول Trizol اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. محلول هموژن به لوله های اپندورف منتقل و یک پنجم حجم، کلروفرم به آن اضافه گشت و سپس لوله به مدت ۳۰ ثانیه شدیداً تکان داده شد و ۵ دقیقه نیز در دمای اتاق قرار گرفت. سپس با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ انجام شد. پس از سانتریفوژ ۲ لایه تشکیل گردید که لایه بی رنگ بالائی حاوی RNA و لایه پائینی حاوی DNA و پروتئین بود. باید دقت کرد هنگام برداشتن مایع رویی مایع حد وسط جمع آوری نشود. فاز بالایی که حامل RNA است با دقت زیاد و با استفاده از سر سمپلر های RNase free برداشته شد و به لوله جدید عاری از RNase منتقل شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر ایزوپروپانل به لوله های محلول RNA اضافه شده و لوله ها ۱ ساعت در فریزر -80°C قرار داده شدند. بعد از آن با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴

درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. با دور ریختن مایع رویی رسوب RNA در ته لوله به دست آمد. زدودن باقیمانده‌های فنل با اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۵ درصد به رسوب RNA و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه، ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام گرفت. RNA نباید به مقدار زیاد خشک می‌شد زیرا حلالیت آن کاهش می‌یافت. در پایان، RNA به دست آمده در 30 μ l آب مقطر عاری از RNase و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳-۳-۱- ارزیابی کمی RNA استخراج شده

این ارزیابی از طریق اندازه‌گیری غلظت RNA انجام می‌پذیرد. برای این منظور، مقدار RNA با روش تعیین دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و مقدار RNA از رابطه زیر به دست آمد.

RNA استخراج شده به نسبت ۱/۵۰ رقیق می‌شود و پس از تنظیم کردن (به اصطلاح، صفر کردن) دستگاه توسط آب مجاور شده با DEPC مقدار جذب نوری نمونه خوانده می‌شود. اگر جذب نوری (OD260) نمونه یک شود بدین معنی است که غلظت RNA برابر با 40 μ g/ml است.

$$\text{RNA} \quad \text{غلظت} \quad \text{g/ml} \mu 40 \times A_{260} = (\text{g/ml} \mu) \times \text{فاکتور رقت} \quad 3-3-12-2$$

محلول نهایی تخلیص شده باید OD260/280 بیشتر از ۱/۸ داشته باشد. نسبت‌های کمتر از ۱/۸ مشخص کننده آلودگی با پروتئین و ترکیبات آروماتیک (نظیر فنل) است.

۳-۳-۵ سنتز cDNA

۱- مواد با نسبت‌های زیر در داخل میکروتیوب با یکدیگر مخلوط گردیدند. لازم به ذکر است این مقدار مواد برای هر واکنش است و تمامی مراحل نیز بر روی یخ انجام گرفت.

| مقدار | معرف |
|--|-------------------------------------|
| ۲ مایکرولیتر | 5 × PrimeScript™ Buffer |
| ۰/۵ مایکرولیتر | PrimeScript™ RT Enzyme Mix I |
| ۰/۵ مایکرولیتر | Oligo dT Primer |
| ۵۰۰ نانوگرم | Total RNA |
| باقیمانده حجم تا رسیدن حجم کل به ۱۰ مایکرولیتر | RNase Free dH₂O |
| ۱۰ مایکرولیتر | مجموع |

۲- محلول به دست آمده در شرایط دمایی زیر اینکوبه شد

الف) ۳۷ درجه سانتیگراد ، ۱۵ دقیقه (رونویسی معکوس)

ب) ۸۵ درجه سانتیگراد ، ۵ ثانیه (غیرفعال‌سازی رونویسی معکوس با حرارت درمانی)

ج) ۴ درجه سانتیگراد

۳-۳-۵-۲ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

cDNA حاصل به طور مستقیم در واکنش‌های RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت و مقادیری

نیز در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد جهت استفاده‌های بعدی ذخیره گردید.

RCR کیفی با استفاده از cDNA های ژن های مورد بررسی و همچنین ژن های پروتئین غیر ساختاری NS1 و کپسیدها با استفاده از PCR انجام شد. علت انجام PCR کیفی برای ژن های مورد بررسی در این تحقیق، مشخص شدن اختصاصیت پرایمر و بهینه کردن دمای مناسب annealing بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های مختلف و مشخصات کامل آنها در جدول ۱-۳ آورده شده است.

تمام مراحل اشاره شده با پرایمرهای Forward و Reverse و ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی، جهت تست حضور cDNA، انجام شد. بتا اکتین جزو ژن های خانه دار (Housekeeping) می باشد که بیان آن در سلول ها ثابت می باشد. یک نمونه کنترل منفی با عنوان NTC نیز تهیه شد که شامل تمامی موارد فوق به غیر از cDNA بود.

نمونه ها به آرامی و بدون ورتکس مخلوط شده و برای تعیین دمای دقیق اتصال پرایمرها، واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر انجام شد.

پس از انجام PCR، محصول واکنش را بر روی ژل آگارز ۲ درصد run کرده و پس از اتمام الکتروفورز از دستگاه gel doc از باندها عکس برداری شد.

جدول ۳-۱. لیست مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

| نام ژن | توالی | T _m | طول محصول (bp) |
|----------------------------------|------------------------|----------------|----------------|
| IL-1β-F | TGCTCTGGGATTCTCTTCAGC | ۵۹/۷۹ | ۱۱۸ |
| IL-1β-R | AAGTCATCCTCATTGCCACTGT | ۵۹/۹۶ | ۱۱۸ |
| IL-6-F | TCAATGAGGAGACTTGCCTG | ۵۷/۲۲ | ۱۸۸ |
| IL-6-R | GTCAGGGGGTGGTTATTGCAT | ۵۷/۸۶ | ۱۸۸ |
| TNF-α-F | GAGGGTTTGCTACAACATGGG | ۵۹/۱۸ | ۱۰۲ |
| TNF-α-R | TCCCCAGGGACCTCTCTCTA | ۶۰/۲۵ | ۱۰۲ |
| NF-κB-F | TCCAGGTCATAGAGAGGCTCA | ۵۹/۴۳ | ۷۱ |
| NF-κB-R | CTGGCAGCTCTTCTCAAAGC | ۵۹/۲۰ | ۷۱ |

نتایج حاصل Primers BLAST نیز در ادامه انجام و آورده شده است:

| Primer pair 1 | Sequence (5'-3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|------------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | TGCTCTGGGATTCTCTTCAGC | 21 | 59.79 | 52.38 | 3.00 | 2.00 |
| Reverse primer | AAGTCATCCTCATTGCCACTGT | 22 | 59.96 | 46.45 | 3.00 | 3.00 |

Products on target templates

>Homo sapiens interleukin 1 beta (IL1B), mRNA

product length = 118

Forward primer 1 TGCTCTGGGATTCTCTTCAGC 21

Template 35 55

Reverse primer 1 AAGTCATCCTCATTGCCACTGT 22

Template 132 132

شکل ۳-۳. نتایج حاصل از Primer BLAST ژن IL-1 β

Primer-BLAST

NCBI Primer-BLAST results: Job ID-SACWUW0046.B1ME5TQ9QC0C04M2Zg [View...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: RefSeq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'→3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|----------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | TCATATGAGAGACTTGCCTG | 20 | 57.22 | 60.00 | 4.00 | 1.00 |
| Reverse primer | GTCAGGGGTGTATTGCAT | 20 | 57.00 | 60.00 | 4.00 | 2.00 |

Products on target templates

>[NM_011515306.1](#) PREDICTED: Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA

product length = 188
 Forward primer 1: TCATATGAGAGACTTGCCTG 20
 Template 772 596

Reverse primer 1: GTCAGGGGTGTATTGCAT 20
 Template 910 829

>[NM_001219005.1](#) Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 2, mRNA

product length = 188
 Forward primer 1: TCATATGAGAGACTTGCCTG 20
 Template 247 266

Reverse primer 1: GTCAGGGGTGTATTGCAT 20
 Template 414 415

>[NM_003911.4](#) Homo sapiens interleukin 6 (IL6), transcript variant 1, mRNA

product length = 188
 Forward primer 1: TCATATGAGAGACTTGCCTG 20
 Template 436 457

Reverse primer 1: GTCAGGGGTGTATTGCAT 20
 Template 625 626

شکل ۳-۴ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن IL-6

Primer-BLAST

NCBI Primer-BLAST results: Job ID-q0Tut8k0tLtp1SG0wZwCPRYY07n0Dw [View...](#)

Input PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: RefSeq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: [Search Summary](#)

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'→3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|---------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | GAGGGTTTGTACACATGGG | 21 | 59.18 | 52.38 | 4.00 | 0.00 |
| Reverse primer | TCCCAAGGAGCTCTCTCA | 20 | 60.25 | 60.00 | 6.00 | 2.00 |

Products on target templates

>[NM_004354.4](#) Homo sapiens tumor necrosis factor (TNF), mRNA

product length = 102
 Forward primer 1: GAGGGTTTGTACACATGGG 21
 Template 804 844

Reverse primer 1: TCCCAAGGAGCTCTCTCA 20
 Template 262 282

شکل ۳-۵ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن TNF-α

Primer-BLAST results

Target PCR template: none
 Specificity of primers: Target templates were found in selected database: RefSeq mRNA (Organism limited to Homo sapiens)
 Other reports: P-Score Summary

Detailed primer reports

| Primer pair 1 | Sequence (5'>3') | Length | Tm | GC% | Self complementarity | Self 3' complementarity |
|----------------|----------------------|--------|-------|-------|----------------------|-------------------------|
| Forward primer | TCGAGTCATAGAGAGGCTCA | 21 | 60.43 | 62.36 | 6.00 | 3.00 |
| Reverse primer | CTGGCACTCTCTCAAAGC | 20 | 59.20 | 55.00 | 6.00 | 3.00 |

Products on target templates

>NM_015300.2 PREDICTED: Homo sapiens nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), transcript variant 12, mRNA

product length = 71
 Forward primer 1 TCAGTCATAGAGAGGCTCA 21
 Template 2151 2151
 Reverse primer 1 CTGGCACTCTCTCAAAGC 20
 Template 2011 2070

>NM_015300.2 PREDICTED: Homo sapiens nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), transcript variant 11, mRNA

product length = 71
 Forward primer 1 TCAGTCATAGAGAGGCTCA 21
 Template 2157 2407
 Reverse primer 1 CTGGCACTCTCTCAAAGC 20
 Template 2437 2456

>NM_015300.2 PREDICTED: Homo sapiens nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), transcript variant 3, mRNA

product length = 71
 Forward primer 1 TCAGTCATAGAGAGGCTCA 21
 Template 2547 2527
 Reverse primer 1 CTGGCACTCTCTCAAAGC 20
 Template 2477 2456

>NM_015300.2 PREDICTED: Homo sapiens nuclear factor kappa B subunit 1 (NFkB1), transcript variant 2, mRNA

product length = 71
 Forward primer 1 TCAGTCATAGAGAGGCTCA 21
 Template 2777 2717
 Reverse primer 1 CTGGCACTCTCTCAAAGC 20

شکل ۳-۶ نتایج حاصل از Primer BLAST ژن NF-κB

۳-۳-۶ آزمایش Real-time PCR

آزمایش real-time PCR بر روی نمونه‌های cDNA مورد آزمایش (RT real-time PCR) انجام گرفت. پس از بدست آوردن باند اختصاصی در PCR، نمونه‌ها تحت سنجش real-time PCR قرار گرفتند. به این منظور از 2x SYBR green master mix ویژه real-time PCR حاوی *Taq* پلیمرز hot start استفاده گردید. رنگ فلئورسنت موجود در master mix آنالیز بسیاری از اهداف مختلف را بدون نیاز به ستنز پروب‌های لیبل شده اختصاصی هدف، امکان پذیر می‌سازد. آزمایش‌ها با دستگاه real-time PCR شرکت ABI انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در quantitative real-time PCR برای ژن‌های مورد نظر همان توالی مورد استفاده در RT-PCR است که در جدول ۳-۱ آورده شده است. مواد واکنشی و برنامه دمایی quantitative real-time PCR به ترتیب در جداول ۳-۲ و ۳-۳ آورده شده است.

از ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی PCR و جهت نرمال کردن نتایج حاصل از هر یک از ژن‌ها استفاده گردید. نمونه‌ها به صورت دو بار تکرار (duplicate) در دستگاه قرار داده شدند تا میانگین آن‌ها مورد محاسبه قرار گیرد. جهت کمی کردن نتایج از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. محتویات هر لوله و شرایط PCR برای ژن‌های مورد مطالعه در جداول زیر آمده است:

جدول ۳-۲. مواد و مقادیر واکنشی quantitative real-time-PCR

| | | |
|---|---------------|------------------|
| Maxima® SYBR Green qPCR Master Mix (2X) | - | 10 μ l |
| Forward Primer | 0.3 μ M | 1 μ l |
| Reverse Primer | 0.3 μ M | 1 μ l |
| Template DNA | ≤ 500 ng | 2 μ l |
| Water, nuclease-free | - | Up to 25 μ l |

جدول ۳-۳. برنامه دمایی quantitative Real Time-PCR

| | | |
|------------------|------------------------|--------|
| Holding Stage | 95°C | 10 min |
| Cycling Stage | 95°C | 15 s |
| | 60°C | 60 s |
| Melt Curve Stage | 95°C | 15 s |
| | 60°C | 60 s |
| | 95°C | 15 s |
| | 40 cycles | |
| | Melting curve analysis | |

۳-۳-۶ اقدامات بیوانفورماتیک

* به دست آوردن توالی ژنی: توالی ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت گردید.

* طراحی پرایمرهای تشخیصی و کلونینگ: پرایمرهای کلونینگ و تشخیصی با استفاده از نرم افزارهای Genrunner و Oligo6 انجام گرفت. به انتهای 5' توالی پرایمر کلونینگ ژن NS1 سایت شناسایی و برش آنزیم BamHI به همراه CGGATCCG overhang جهت بالابردن میزان راندمان برش اضافه گردید. پرایمرهای تشخیصی در طیف اندازه ۸۰ تا ۲۰۰ نوکلئوتید طراحی شدند و نکات زیر در طراحی آنها مورد توجه قرار گرفت:

- طول آنها بین ۳۰-۱۵ نوکلئوتید باشد.
- غلظت مطلوب G و C در پرایمر ۴۰-۶۰ درصد است.
- تعداد باز A و T و نیز G و C در پرایمرها در صورت امکان برابر باشد.
- ساختار پرایمرها باید عاری از نواحی تکراری باشد تا از تشکیل مناطق لوپ مانند و سنجاق سری و دایمر جلوگیری شود.
- ساختار پرایمرها فاقد مناطق غنی از پورین یا پیریمیدین باشد.
- انتهای دو پرایمر نباید مشابه هم باشد تا از تشکیل دایمرهای پرایمری ممانعت شود.
- بهتر است در قسمت 5' باز A یا T و در قسمت 3' پرایمر باز G یا C باشد.
- T_m پرایمرها اصولاً باید در محدوده ۷۰-۵۵ باشد و در هر دوی آنها مقادیر تقریباً یکسانی داشته باشد. نباید اختلاف T_m دو پرایمر بیشتر از ۵ درجه باشد.

فصل ۴

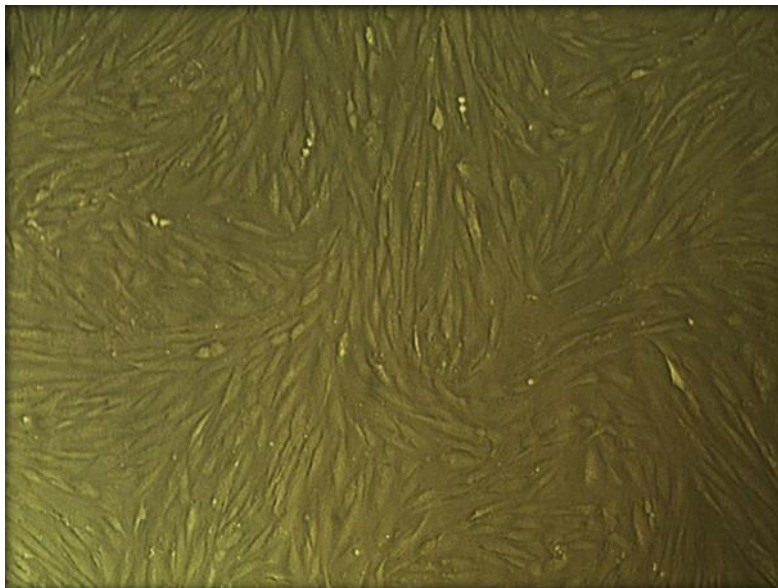
نتایج

۴-۱ نتایج و یافته‌ها:

۴-۱-۱ تأیید سلول‌های مزانشیمی

۴-۱-۱-۴ ریخت‌شناسی^{۴۷}

سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده پاساژ سوم مشتق از مغز استخوان انسانی، در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $400\times$ از لحاظ ریخت‌شناسی، بررسی شده و از آن‌ها عکس‌برداری صورت گرفت. همان‌طور که در عکس ۴-۱ دیده می‌شود، این سلول‌ها، از نوع چسبنده^{۴۸}، شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل هستند.



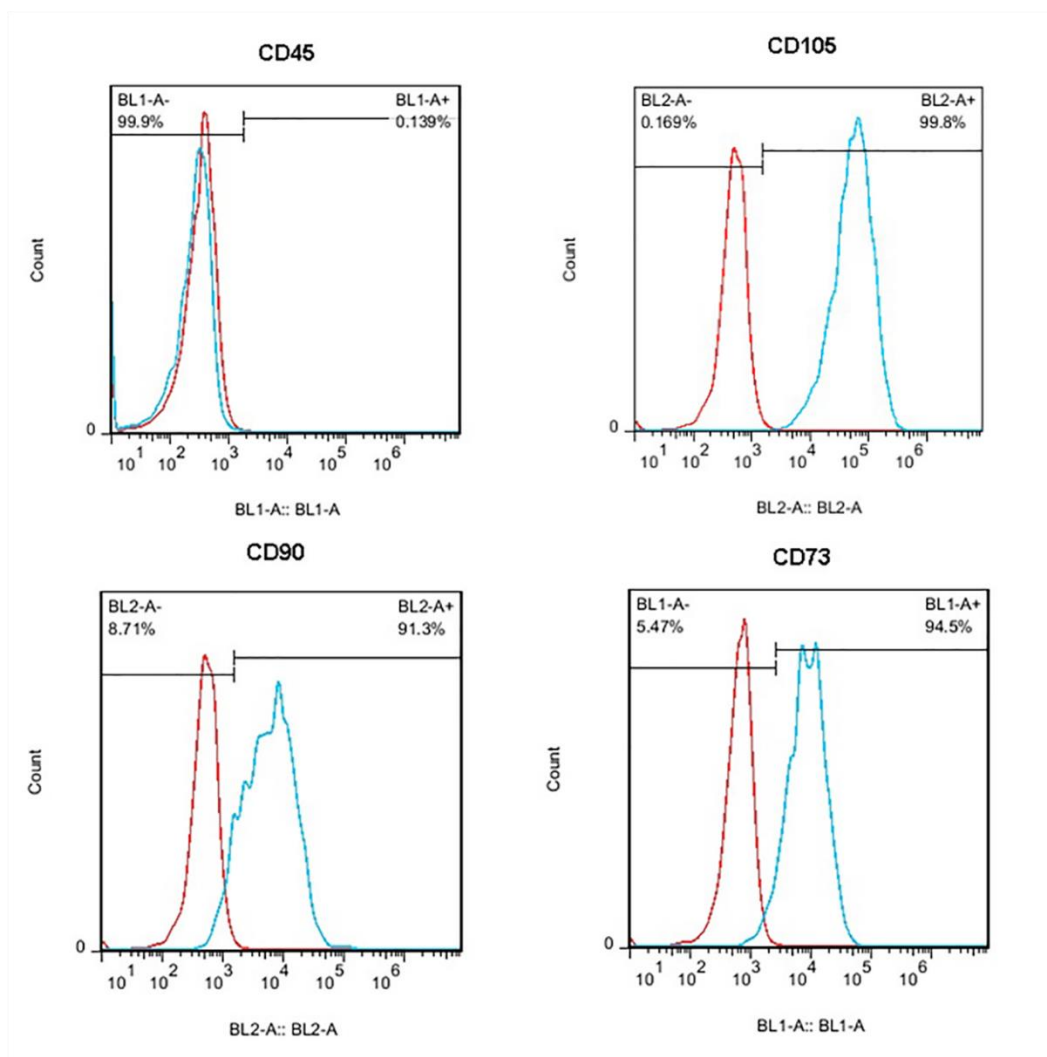
شکل ۴-۱. سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی در زیر میکروسکوپ نوری. این سلول‌ها، از نوع چسبنده، شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل هستند.

^{۴۷} Morphology

^{۴۸} Adherent

۲-۱-۱-۴ فلوسایتومتری:

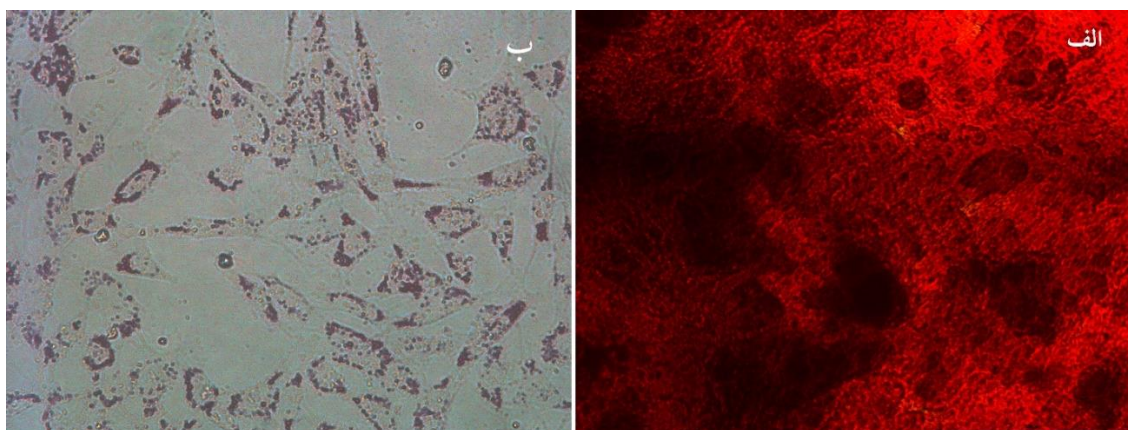
همان‌طور که اشاره شد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی، آنتی‌ژن‌های سطحی خاصی را بر روی خود بیان کرده و در مقابل، عاری از برخی آنتی‌ژن‌های خاص بر روی سطح خود می‌باشند. تشخیص و تأیید هویت این سلول‌ها توسط فلوسایتومتری، برای مارکرهای CD45، CD105، CD90 و CD73 انجام گرفت که نتایج به صورت هیستوگرام در شکل ۴-۲ آورده شده است. در این شکل همان‌طور که مشاهده می‌گردد، سلول‌های مورد بررسی برای مارکر CD45، منفی و برای CD مارکرهای ۱۰۵، ۹۰ و ۷۳ مثبت می‌باشند؛ که مهر تأییدی بر هویت آن‌ها مبنی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی است.



شکل ۴-۲. هیستوگرام فلوسایتومتری ۴ CD مارکر سطح سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان جهت تأیید هویت این سلول‌ها. این سلول‌ها طبق انتظار، برای مارکر CD45، منفی و برای CD مارکرهای ۹۰، ۱۰۵ و ۷۳ مثبت می‌باشند.

۳-۱-۱-۴ تمایز به سلول‌های رده استخوانی^{۴۹} و چربی^{۵۰}:

پیش‌تر در فصل نخست نیز اشاره شد که از دیگر فاکتورهای تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توان تمایزی این سلول‌ها به سلول‌های رده استخوانی و چربی است. همان‌طور که شکل ۳-۴ نشان می‌دهد،



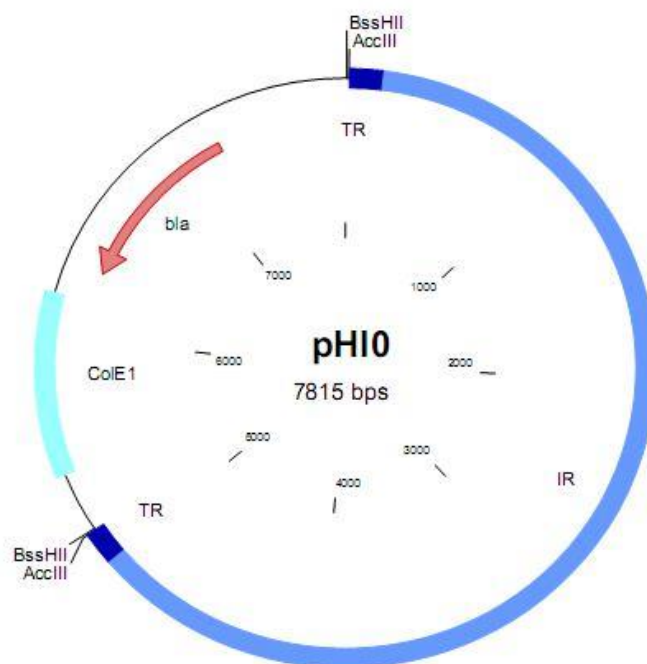
شکل ۳-۴. الف - رنگ‌آمیزی سلول‌های تک‌هسته‌ای با **Alizarin-Red** ب - رنگ‌آمیزی سلول‌های تک‌هسته‌ای با **Oil-Red** (۹ روز پس از رشد در محیط‌های القای استئوبلاستی و ادیپوسایتی)

۴-۱-۱-۴ تأیید ترنسفورماسیون پلاسمید حاوی ژنوم پاروویروس **B19**

۴-۲-۱ پلاسمید نو ترکیب pH10 حاوی ژنوم PVB19 با نقشه زیر که هدیه ارزنده‌ای از طرف پروفیسور گالینا می‌باشد از ایشان دریافت شد.

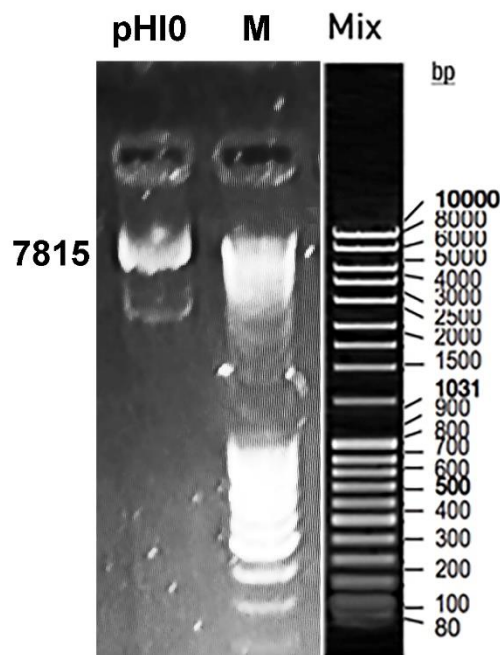
۴۹ Osteoblast

۵۰ Adipocyte



شکل ۴-۴: وکتور pH10 که حاوی ژنوم پاروویروس B19 می‌باشد.

پس از ترنسفورماسیون باکتری DH5 α با پلاسمید، طبق پروتکل مرسوم و سپس تکثیر باکتری به جهت ازدیاد پلاسمید و همچنین، استخراج پلاسمید با استفاده از روش ذکر شده در فصل سوم، جهت تأیید طول پلاسمید مذکور، الکتروفورز و عکس‌برداری انجام گرفت. اندازه پلاسمید pH10، ۷۸۱۵ جفت باز است که نتیجه الکتروفورز این اندازه را تأیید می‌کند.

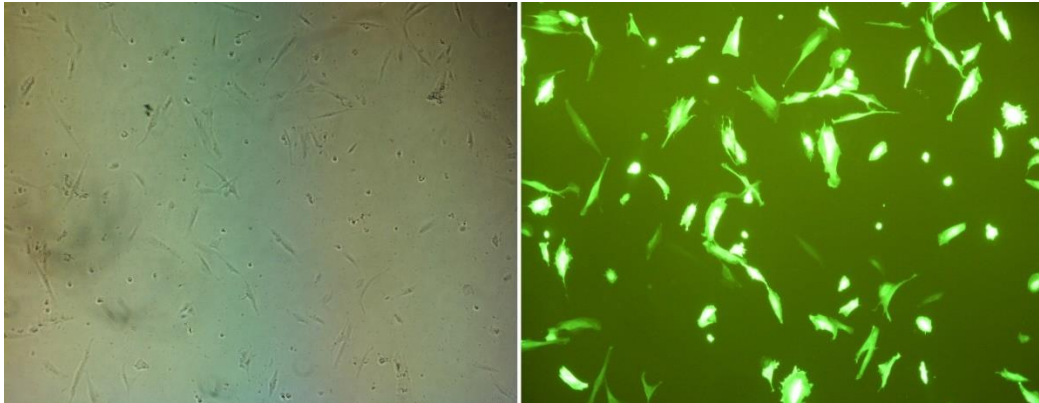


شکل ۴-۵. الکتروفورز پلاسمید pH10 تکثیر یافته در باکتری DH5α همان طور که مشاهده می گردد، اندازه پلاسمید که ۷۸۱۵ باز است با توجه به Ladder، کاملاً تأیید شده است.

۵-۱-۱-۴ تأیید آلوده سازی سلول های مزانشیمی مغز استخوان با پلاسمید pH10

تأیید ورود پلاسمید حاوی ژنوم PVB19 با استفاده از گزارشگر GFP و میکروسکوپ فلورسنت

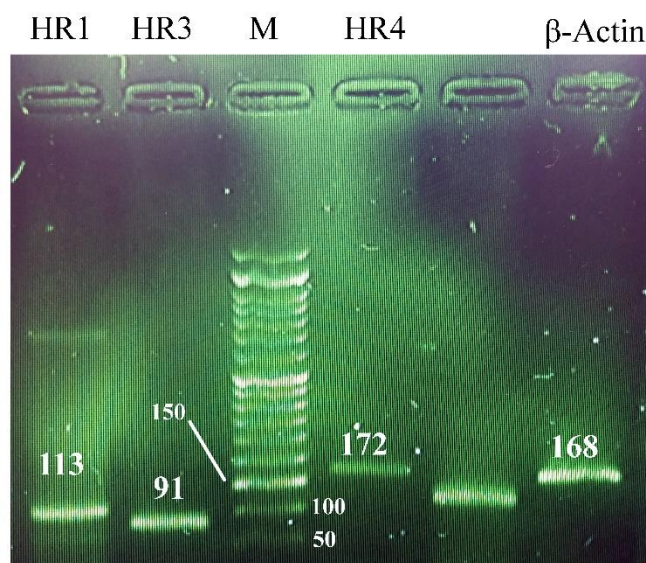
پس از آلوده سازی گروه های سلول های مزانشیمی مغز استخوان انسانی با پلاسمید حاوی ژنوم PVB19، توسط نوکلئوفکتور، یک گروه از سلول های نیز با وکتور گزارشگر GFP آلوده گشت و پس از ۳۶ ساعت جهت تأیید ورود وکتور، توسط میکروسکوپ فلورسنت از سلول ها عکس گرفته شد؛ که تصویر نیز گویای کارایی بالای این روش جهت آلوده سازی سلول ها است.



شکل ۴-۶. تصویر سلول‌های آلوده شده با گزارشگر GFP، حاصل از میکروسکوپ فلورسنت.

تأیید بیان ژن پروتئین‌های ویروسی در داخل سلول‌های مزانشیمی آلوده شده به پلاسمید حاوی ژنوم PVB19

۳۶ ساعت پس از آلوده‌سازی hBM-MSCHa بیان ژن پروتئین غیرساختاری اصلی (NS1) و ژن پروتئین‌های کپسید ویروسی (VP1 و VP2) توسط RT-PCR و به ترتیب با استفاده از پرایمرهای HR1، HR3 و HR4 انجام و از ژل عکس‌برداری شد و با توجه به طول محصولات، بیان ژن‌های مورد بررسی، فعالیت ویروس را در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان تأیید کرد. لازم به ذکر است که از ژن بتا-اکتین به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد (شکل ۵-۶).

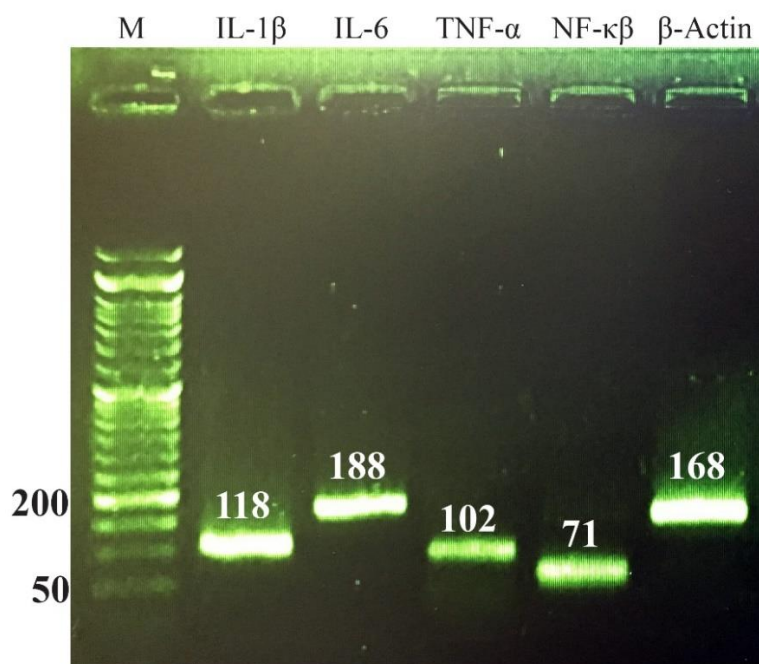


شکل ۴-۷. عکس ژل الکتروفورز بیان ژن NS1 و پروتئین‌های کپسید پاروویروس B19 در داخل hBM-SCMs. از چپ به راست: (۱) محصول فعالیت پرایمر HR1 که ژن پروتئین غیرساختاری اصلی ویروس (NS1) را تکثیر می‌کند. (۲) محصول فعالیت پرایمر HR3 که ژن پروتئین کپسید ویروس (VP1) را تکثیر می‌کند. (۳) Ladder (۴) محصول فعالیت پرایمر HR4 که ژن پروتئین کپسید ویروس (VP2) را تکثیر می‌کند. (۵) محصول فعالیت پرایمر ژن خانه دار بتا-اکتین

۴-۱-۲-۱ نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR و تأیید کارایی و اختصاصیت پرایمرهای

طراحی شده

برای سنجش کیفی cDNA، تنظیم دمای اتصال پرایمرها و اطمینان از انجام صحیح پروسه، ابتدا PCR و سپس الکتروفورز بر روی ژل انجام گرفت. در این واکنش از cDNA سنتز شده به عنوان نمونه و از پرایمرهای ریل تایم به عنوان پرایمر معمولی استفاده کردیم. نتیجه حاصل از یکی از واکنش‌ها در قالب الکتروفورز، در شکل ۴-۸ آورده شده است.

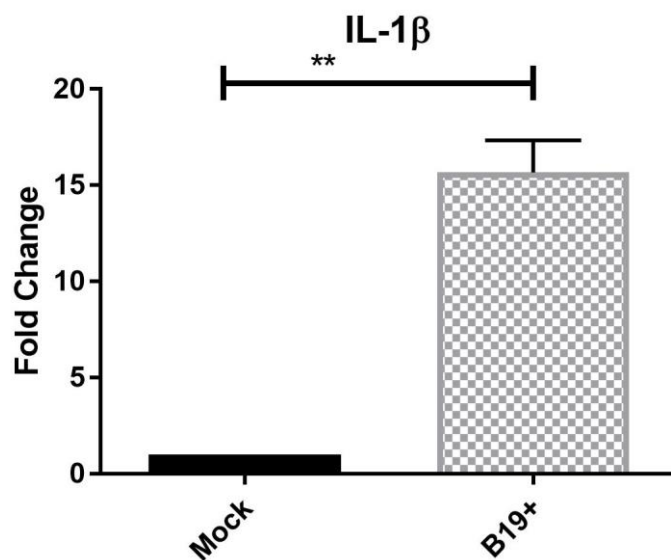


شکل ۴-۸ نتایج حاصل از RT-PCR قیل از انجام qPCR برای سنجش صحت فعالیت پرایمرهای طراحی شده و همچنین تعیین دمای مناسب اتصال پرایمرها. در این run ژن بتا-اکتین به عنوان ژن خانه دار استفاده شده است.

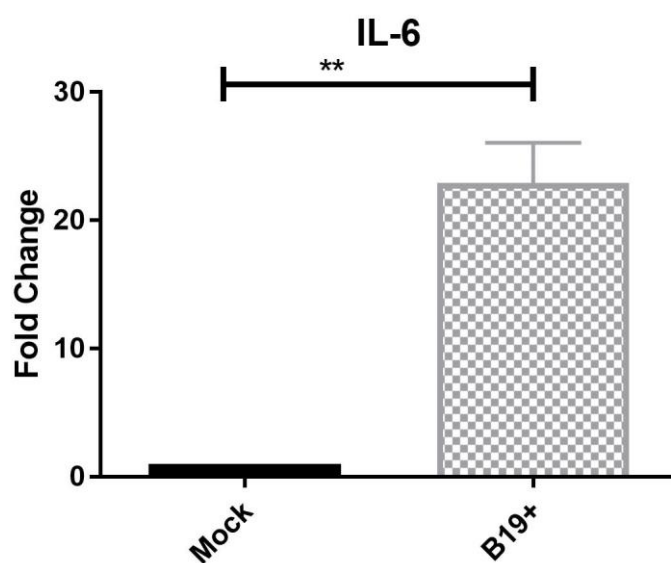
۲-۱-۴ نتایج حاصل از آزمایش Real-time PCR

جهت ارزیابی کمی بیان هر ۴ ژن مذکور دخیل در التهاب، ۲۴ ساعت پس از آلوده‌سازی، RNA تام استخراج، cDNA سنتز و با استفاده از پرایمرهای مربوطه، آزمایش real-time PCR انجام شد. این عمل برای هر دو گروه اصلی (آلوده شده با وکتور حاوی ژنوم B19V) و گروه موسوم به Mock (آلوده شده با وکتور بدون ژنوم B19V) انجام پذیرفت و بیان کمی هر ژن در هر دو گروه، با هم مقایسه شد. در این آزمایش پرایمر ژن بتا-اکتین به عنوان ژن خانه دار استفاده و داده‌های حاصل نیز به کمک نرم‌افزار graphpad prism تفسیر شد.

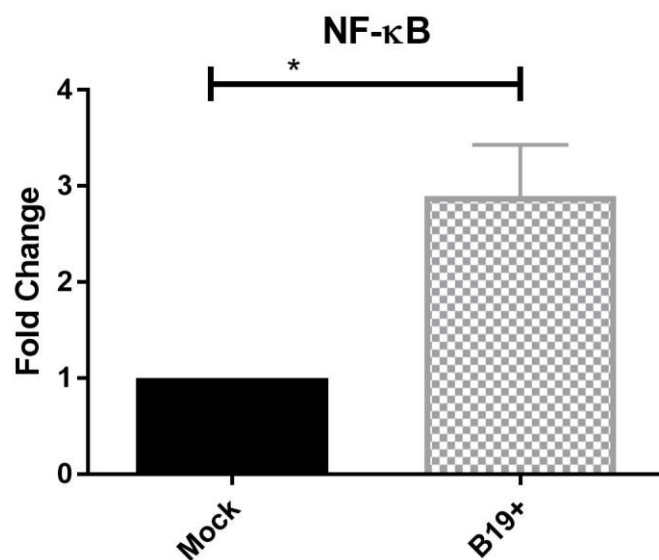
تغییرات بیان هر ژن در نمودارهای ۴-۱ الی ۴-۴ آورده شده است. میزان بیان در گروه آزمایش (B19+) در برابر نتیجه حاصل از بیان گروه کنترل (Mock) نرمال‌سازی و بیان گروه کنترل به صورت عدد ۱ نمایش داده شده است.



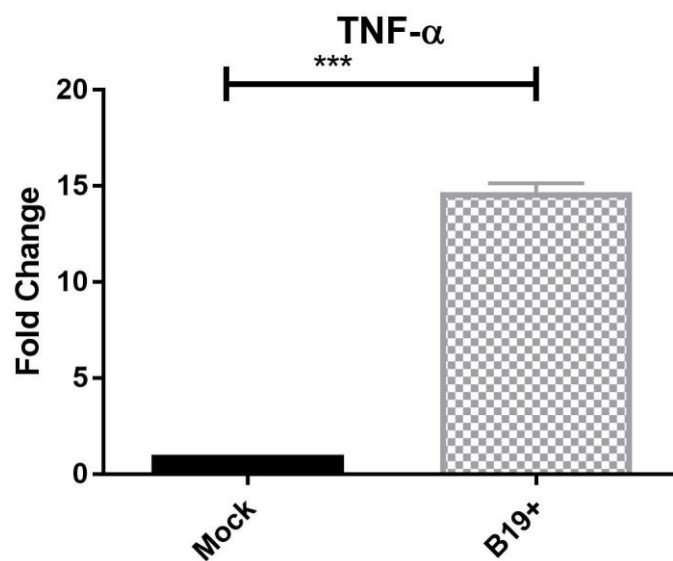
نمودار ۴-۱ نمودار تغییرات بیان ژن $IL-1\beta$ در گروه سلول‌های آلوده شده با پلاسמיד حاوی ژنوم B19V در مقایسه با گروه کنترل (Mock) که با همان وکتور اما عاری از ژنوم B19V آلوده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیان ژن $IL-1\beta$ به صورت معنادار و با $p=0.0043$ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش نشان می‌دهد.



نمودار ۲-۴ نمودار تغییرات بیان ژن IL-6 در گروه سلول‌های آلوده شده با پلاسمید حاوی ژنوم B19V در مقایسه با گروه کنترل (Mock) که با همان وکتور اما عاری از ژنوم B19V آلوده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیان ژن IL-6 به صورت معنادار و با $p=0.0069$ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش نشان می‌دهد.

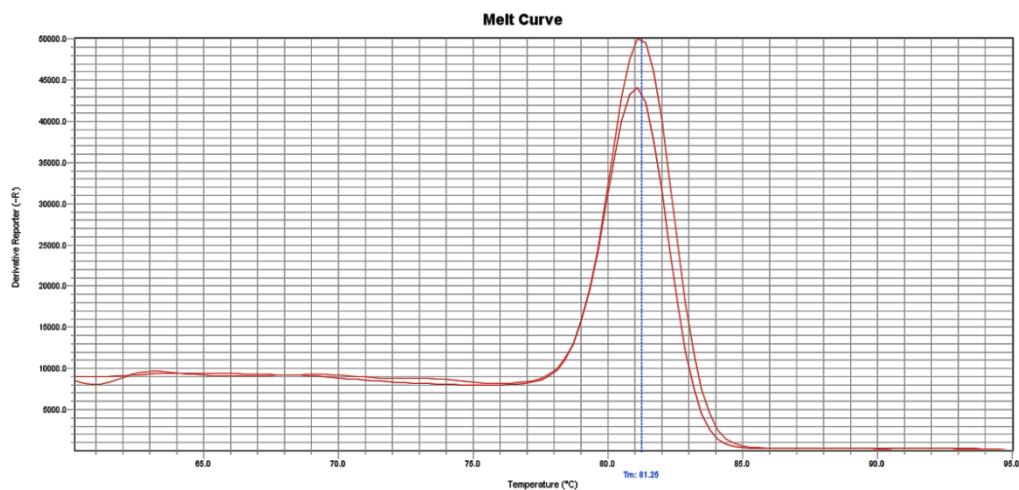


نمودار ۳-۴ نمودار تغییرات بیان ژن NF-κB در گروه سلول‌های آلوده شده با پلاسمید حاوی ژنوم B19V در مقایسه با گروه کنترل (Mock) که با همان وکتور اما عاری از ژنوم B19V آلوده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیان ژن NF-κB به صورت معنادار و با $p=0.0198$ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش نشان می‌دهد.

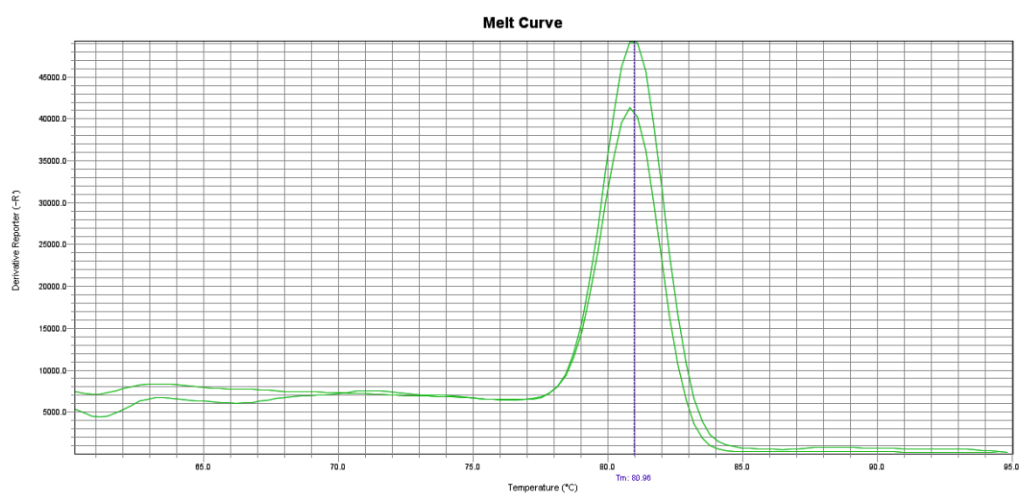


نمودار ۴-۴ نمودار تغییرات بیان ژن $TNF-\alpha$ در گروه سلول‌های آلوده شده با پلاسمید حاوی ژنوم B19V در مقایسه با گروه کنترل (Mock) که با همان وکتور اما عاری از ژنوم B19V آلوده شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیان ژن $TNF-\alpha$ به صورت معنادار و با $p=0.0004$ در مقایسه با گروه کنترل، افزایش نشان می‌دهد.

به منظور تأیید نتایج و اطمینان از صحت آزمایش، منحنی‌های ذوب^{۵۱} نیز بررسی گردید. تصاویر ۸-۴ و ۱۱-۴ نشان‌دهنده منحنی‌های ذوب ژن‌های مورد مطالعه است.

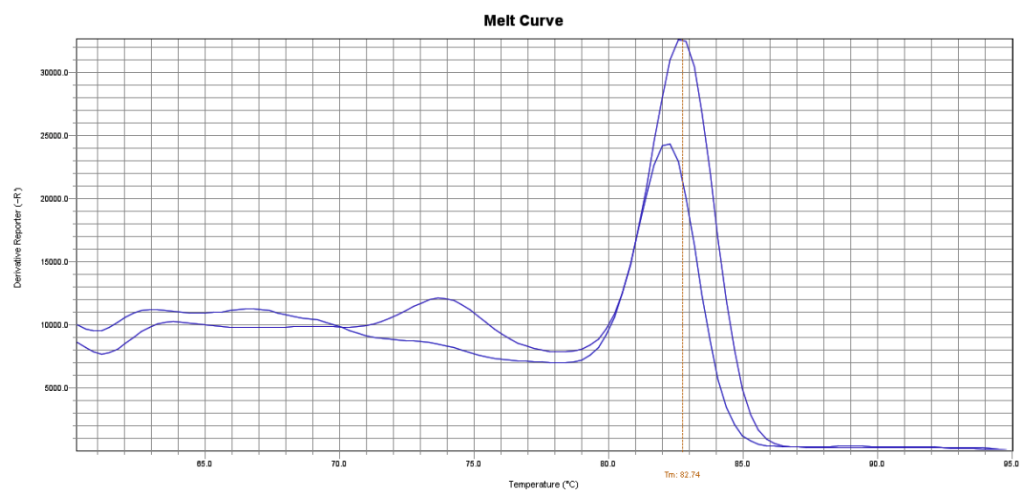


شکل ۸-۴. نتایج دمای ذوب برای ژن IL-1 β

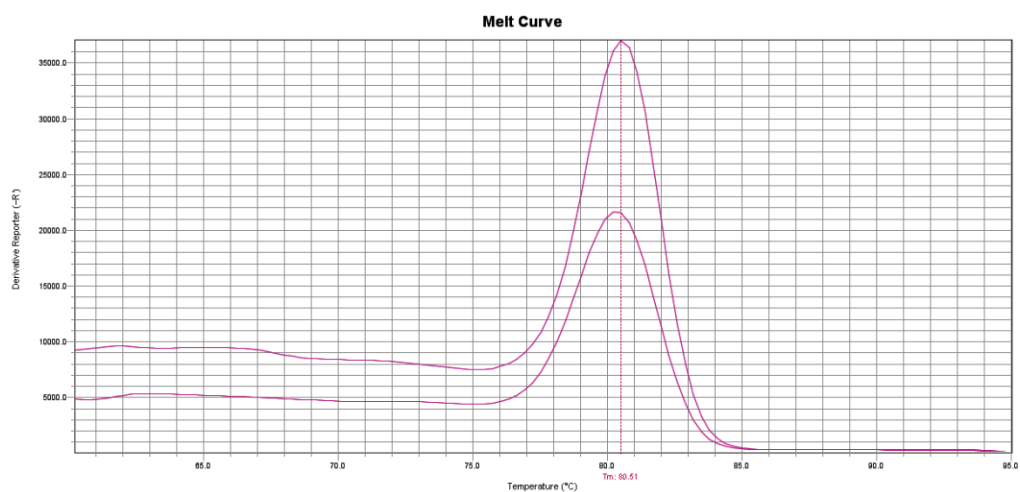


شکل ۹-۴. نتایج دمای ذوب برای ژن IL-6

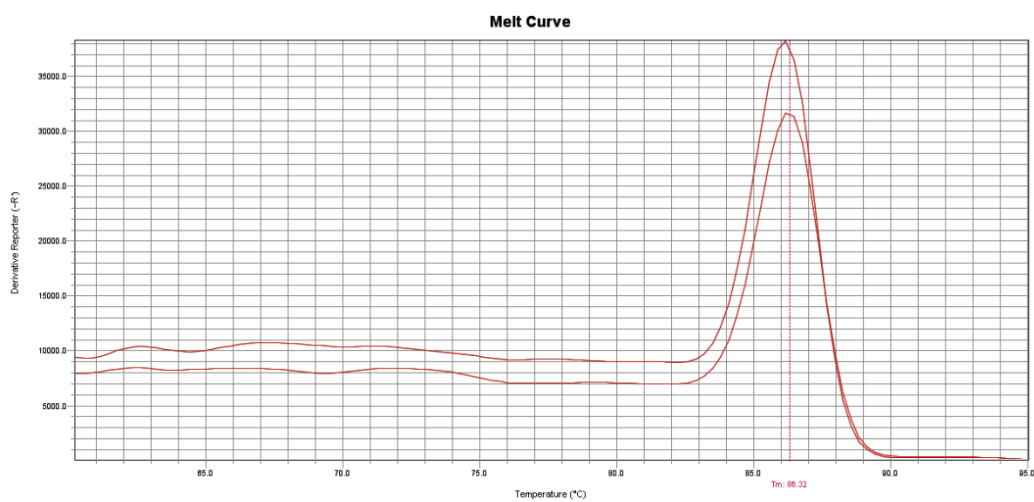
^{۵۱} Melt curves



شکل ۴-۱۰. نتایج دمای ذوب برای ژن $\text{TNF-}\alpha$



شکل ۴-۱۱. نتایج دمای ذوب برای ژن NF-Kb



شکل ۴-۱۲. نتایج دمای ذوب برای ژن β -Actin

فصل ۵

بحث و نتیجه گیری

۱-۵ بحث

همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شد، کشف ارتباط التهاب مزمن با شکل‌گیری و توسعه سرطان به عنوان یک بیماری پیچیده، به بیش از یک قرن و نیم قبل و تحقیقات آقای رودالف ویرچاو بازمی‌گردد. مشاهدات وی مبنی بر این که سلول‌های التهابی به محیط تومور نفوذ کرده بودند منجر به ارائه این فرضیه شد که سرطان، برخاسته از مناطق التهابی است. در دهه‌های اخیر نیز نظریه آقای ویرچاو توسط مستندات بسیاری به اثبات رسیده و نشان داده شده است که بسیاری از سرطان‌ها توسط عفونت و متعاقباً التهاب مزمن آغاز می‌گردند. در ریز محیط تومور سایتوکاین‌ها و واسطه‌های شیمیایی پیش‌التهابی بسیاری از جمله $\text{TNF-}\alpha$ ، IL-6 ، $\text{IL-1}\beta$ ، $\text{NF-}\kappa\text{B}$ و یا ضد التهابی نظیر IL-10 و $\text{TGF-}\beta$ حضور دارند. در التهاب مزمن، سایتوکاین‌هایی مانند $\text{TNF-}\alpha$ و IL-6 تولید رادیکال‌های آزاد را القا می‌کنند که می‌توانند باعث آسیب DNA و متعاقباً ایجاد جهش و نهایتاً شکل‌گیری تومور شوند. رشد و توسعه این تومور نیز به نوبه خود توسط سایتوکاین‌های دیگری رخ خواهد داد. سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مذکور همچنین می‌توانند رگزایی را افزایش داده و نیز باعث رخداد متاستاز شوند و از این حیث نقش بسیار مهمی را بازی می‌کنند. در ادامه، سایتوکاین‌هایی نظیر IL-8 نیز نقشی مهم در مهاجرت سلول‌ها به بافت‌های دیگر دارند (۳، ۸، ۹، ۱۵۵، ۱۵۸، ۱۵۹، ۱۶۳). در ارتباط با $\text{NF-}\kappa\text{B}$ به عنوان یک واسطه شیمیایی، در کنار نقش بسیار مهم آن در هماهنگی رویداد التهاب و پاسخ ایمنی که در فصل نخست اشاره شد، باید این نکته را عنوان کرد که فعال‌شدن آن در سلول‌های ایمنی به هنگام رخداد التهاب، می‌تواند مانند یک چرخه، باعث فعال‌شدن سایتوکاین‌هایی گردد که خود آن‌ها مجدداً موجب فعال‌شدن $\text{NF-}\kappa\text{B}$ در سلول‌های سرطانی می‌شوند و این فعالیت نیز موجب افزایش سایتوکاین‌هایی می‌گردد که سلول‌های التهابی بیشتری را به محل تومور

می‌کشانند. به این چرخه، Feed-Forward گفته می‌شود (۲, ۹). ضمناً در بحث گسترش تومور، مکانیسم‌های ایمنی و التهابی ضد توموری و تومورزا به صورت همزمان وجود دارند که اگر تومور از بین نرود در نهایت، مکانیسم تومورزا غالب خواهد شد (۲).

در مقاله Russell L. Blaylock در سال ۲۰۱۵ در ایالات متحده، نویسنده مجدداً ضمن اشاره به نقش اساسی التهاب مزمن با سرطان‌زایی، به موارد مختلف مولد این التهاب دائمی، مانند مواد شیمیایی، چاقی، هایپرگلیسمی، عفونت مداوم، بیماری‌های خودایمنی و فلزات سنگین سرطان‌زا اشاره می‌کند و در ادامه نقش ریزمحیط سرطانی را تشریح می‌کند. در این مقاله ویروس‌های مختلف از جمله HPV، هرپس ویروس، هپاتیت، هلیکوباکتر پیلوری به عنوان ویروس‌های ایجادکننده التهاب مزمن آورده شده‌اند. در ارتباط با سایتوکاین‌ها باید اشاره کرد که $TNF-\alpha$ یکی از مهم‌ترین فعال‌کنندگان $NF-\kappa B$ به شمار می‌رود و شواهد بسیاری مبنی بر افزایش $TNF-\alpha$ و فعالیت تهاجمی بسیاری از سرطان‌ها مانند گلیوبلاستوما، سرطان استخوان سر و گردن، AML و غیره در دسترس است (۱۶۴-۱۶۷). فاکتورهای رشد مانند EGF و گیرنده‌های رشد مانند HER2 و EGFR به طور عمومی در سرطان‌های مختلفی فعال می‌شوند و آن‌ها نیز $NF-\kappa B$ را فعال می‌کنند (۱۶۷, ۱۶۸). البته فاکتورهای رشد، STAT3 را نیز فعال می‌کنند (۱۶۹). سایتوکاین پیش‌التهابی IL-6 نیز همان‌طور که قبلاً اشاره شده است باعث فعال شدن $NF-\kappa B$ و STAT3 شده و $NF-\kappa B$ نیز یک کنترل‌کننده اصلی تولید IL-6 است (۱۷۰). $NF-\kappa B$ همچنین با ژن‌های به شدت تومورزا مانند cFLIP, Bcl-sl, Bcl-2 و surviving در ارتباط است. فاکتور هسته‌ای κB همچنین با ژن‌های کنترل‌کننده مسیرهای سرطان‌زای دیگر مثل cyclinD1, c-myc, cyclooxygenase-2, metalloproteinase، فاکتور رشد اندوتلیالی عروقی، CXCR4 و TWIST مرتبط می‌باشد. تمام این مکانیسم‌های پیام‌رسانی

سلولی رشد و تکثیر و تهاجم و متاستاز تومور را کنترل می‌کنند (۱۷۱). همان‌طور که پیش‌تر نیز اشاره شده ریزمحیط التهابی نقش اساسی را در تبدیل سلول‌های بنیادی نرمال به سلول‌های بنیادی سرطانی دارد و تحقیقات جدید بیان‌کننده این مطلب هستند که سلول‌های موجود در استروما تأثیر اساسی بر رفتار سلول‌های بنیادی دارند. به‌طور مثال، Rao و همکاران ثابت کردند که سلول‌های اندوتلیال از طریق تنظیم آزادسازی کموکاین CXCL12، نقش حیاتی در توسعه و رفتار تومورهای مالتی‌فرم گلیوبلاستوما بازی می‌کنند (۱۷۲). تأثیر سلول‌های استرومایی در سرطان‌های دیگر نیز به روشنی به اثبات رسید است (۱۷۳).

از سوی دیگر، بدیهی‌ست هر عاملی که باعث ایجاد یک التهاب مزمن در بافت‌های بدن گردد می‌تواند خود را با تومورزایی مرتبط سازد و از آنجایی که سرطان یکی از مهم‌ترین مسائل این روزهای زندگی بشر است، کشف این ارتباط بسیار مهم می‌نماید. عوامل مختلفی باعث ایجاد التهاب مزمن می‌گردند که از آن جمله می‌توان به عوامل میکروبی به عنوان یک فاکتور برجسته اشاره نمود. در این خصوص بررسی ویروس‌های شایع مانند پاروویروس B19 که اتفاقاً قابلیت نهفته ماندن و عفونت پایدار^{۵۲} و مادام‌العمر را در سلول‌های غیر اریثروئیدی دارد (۱۵۳)، می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشد. امروزه عفونت میکروبی به عنوان یک آغازگر مهم تومورزایی ناشی از التهاب پذیرفته شده است و می‌توان به قطعیت گفت که ۲۰٪ از کل سرطان‌ها در سطح دنیا ناشی از عفونت‌های میکروبی‌ست (۱۶۳). تحقیقات متعددی در زمینه ارتباط انواع ویروس‌ها با تومورزایی به خصوص بدخیمی‌های خونی از طریق ایجاد التهاب یا تغییرات اپی‌ژنتیک انجام گرفته است. Catherine de Martel و Silvia Franceschi در سال ۲۰۰۹ در فرانسه نشان دادند که القای التهاب توسط آلودگی‌های باکتریایی و یا ویروسی

^{۵۲} Persistent infection

ریسک ابتلا به سرطان را افزایش می‌دهد (۱۳). ویروس‌های آنکوژنیک ^{۵۳}HTLV-1، ^{۵۴}HPV، ^{۵۵}HHV-8، ^{۵۶}EBV، ^{۵۷}HBV و ^{۵۸}HCV (۲۵-۱۴) می‌توانند با تغییرات اپی‌ژنتیک، سلول را دست کم به فاز پیش‌سرطانی برده یا این که خود، عامل اصلی شکل‌گیری سرطان باشند. همان‌طور که اشاره شد یکی از مکانیسم‌های تغییرات اپی‌ژنتیک، تغییر وضعیت متیلاسیون DNA ژنومی یا یک ژن خاص می‌باشد (۳۸). برخی از ویروس‌ها ممکن است حاوی ژن‌هایی باشند که محصول پروتئینی آن می‌تواند سلول را استحاله کرده و روند تومورزایی را تسریع کند. ویروس‌های توموری به هر دو خانواده DNA ویروس‌ها و RNA ویروس‌ها تعلق دارند و خصوصیت دیگر این ویروس‌ها آن است که سبب عفونت پایدار می‌شوند تا از سیستم ایمنی بدن در امان بمانند. در طی عفونت پایدار، ویروس از بیان ژن‌هایی از ژنوم خود که سبب پاسخ ایمنی می‌شوند جلوگیری می‌کند (۳۹).

علاوه بر ویروس‌های اشاره شده که نقش آن‌ها در تومورزایی به خوبی نشان داده شده است، پاروویروس B19 نیز در چندین مطالعه، رابطه تنگاتنگی را با سرطان‌های خون از خود نشان داده است. هر چند که هنوز سرطان‌زایی آن به اثبات نرسیده ولی مطالعات، حاکی از احتمال بالای دخالت ویروس در لوسمی‌ها دارد. در مطالعه‌ی Fritch Lilla و همکاران در سال ۲۰۱۵ وجود تیترا بالای از ویروس در بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد مشخص شده است

^{۵۳} Human T-cell leukemia virus type I

^{۵۴} Human papilloma virus

^{۵۵} Human herpes virus 8

^{۵۶} Epstein-barr virus

^{۵۷} Hepatitis B virus

^{۵۸} Hepatitis C virus

(۲۶). Vasconcelos و همکاران، وجود عفونت ویروسی را با تغییر اپی ژنتیکی متیلاسیون در لوسمی‌های حاد ارتباط داده‌اند (۲۷). Ibrahem و همکاران نیز ارتباط بین عفونت با این ویروس و لوسمی‌های حاد را مطرح نموده‌اند (۲۸). ارتباط ذکر شده در گزارش Jitschin و همکاران نیز مشاهده می‌شود (۲۹). همچنین، رابطه معنادار بین عفونت با پاروویروس B19 و لوسمی حاد در تحقیقات Alba و همکاران در سال ۲۰۰۶ و دو مطالعه جداگانه‌ی Yetgin و همکاران (۲۰۰۰ و ۲۰۰۴) نشان داده شده است (۳۰-۳۲).

با توجه به این که طبق مقاله منتشر شده آقای Mikael Sundin و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در کشور سوئد، پاروویروس با بیان گیرنده B19V یعنی آنتی ژن P (گلوبوساید) و کمک گیرنده آن (Ku 80) در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان عفونت مداوم ایجاد می‌کند (۱۶۲)، از نوآوری‌های این مطالعه بررسی بیان مهم‌ترین ژن‌های دخیل در التهاب با استفاده از وکتور خاص حاوی ژنوم B19V در سلول‌های بنیادی مغز استخوان انسانی به عنوان یک میزبان غیراریتروئیدی است که پیش از این انجام نگرفته است. پس از کشت hBM-MSCها و آلوده‌سازی آن‌ها با وکتور یاد شده، ارزیابی بیان چهار ژن $IL-1\beta$ ، $IL-6$ ، $TNF-\alpha$ و $NF-\kappa B$ در سلول‌های آلوده شده انجام پذیرفت و نتایج، حکایت از افزایش معنادار هر چهار ژن داشت. همان‌طور که در فصول قبل به طور مبسوط اشاره شد، عفونت با پاروویروس B19 یک نگرانی بین‌المللی است (۴۹) و شیوع آن بین ۲ تا ۱۰ درصد در کودکان زیر ۵ سال، از ۴۰ تا ۶۰ درصد در بالغین بیشتر از ۲۰ سال و بیش از ۸۵ درصد در جمعیت کهنسال بوده و از این حیث، بسیار فراگیر است (۵۱). در عمل پیوند سلول‌های بنیادی، از هر ۲۰ نفر دهنده سالم^۹ یک نفر دارای DNA پاروویروس B19 است. در ایالات متحده، ۵۵٪ الی ۶۵٪ از زنانی که در

^۹ Healthy donor

سن باروری هستند در بین آنتی‌بادی‌های سرم خود، ایمونوگلوبولین G (Ig-G) اختصاصی پاروویروس B19 و ۳۵٪ باقی، استعداد آلوده شدن با این ویروس را دارند (۴۰). هر چه پیش می‌رویم، تحقیقات بیشتر و شیوه‌های ملکولی دقیق‌تری برای تشخیص عفونت با این ویروس ابداع می‌شوند که نشان‌دهنده اهمیت موضوع است. به طور مثال دو سال پیش و در سال ۲۰۱۵ روش سنجش Real-time PCR جدیدی برای تشخیص RNA ویروس هپاتیت A و DNA پاروویروس B19 توسط Marijke W.A. و همکاران در هلند به ثبت رسید (۱۷۴).

در ادامه بحث اشاره به موضوع سلول‌درمانی ضروری می‌نماید. مبحث سلول‌درمانی و استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان انواع بیماری‌ها این روزها از جمله مباحث بسیار مهم و جذاب در علوم پزشکی و پیراپزشکی است و در واقع استفاده از MSCها به دلیل جداسازی و کشت آسان، توانایی بسیار بالا در تمایز، تولید فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها و اثرات تنظیمی بر روی سیستم ایمنی، بسیار مورد علاقه محققان در سراسر دنیا است. اگر بخواهیم جزئی‌تر بنگریم از صفات اصلی سلول‌های بنیادی که آن‌ها را برای سلول‌درمانی مناسب می‌کند، یکی قابلیت خودنوسازی^{۶۰} است؛ به این معنا که این سلول‌ها می‌توانند بدون این که خاصیت بنیادی خود را از دست بدهند به صورت تمایزنیافته تقسیم شوند و دیگر خصوصیت این سلول‌ها نیز قابلیت تمایز به طیف وسیعی از انواع سلول‌هاست. به طور کلی سلول‌های بنیادی را می‌توان به دو گروه سلول‌های بنیادی رویانی (EPCs) که از توده سلولی داخلی (ICM) یک بلاستوسیست منشأ می‌گیرند و سلول‌های بنیادی بالغ (ASCs) که از خون بند ناف، مغز استخوان، خون محیطی و یا از بافت‌ها و ارگان‌های خاص بدن یک فرد بالغ به دست می‌آیند، تقسیم نمود. ASCها در مرحله G0 و G1 چرخه سلولی باقی می‌مانند و در مناطق مشخصی

۶۰ Self-renewal

قرار دارند که خاصیت خودنوسازی آن‌ها حفظ می‌گردد. به این مناطق آشیانه سلول‌های بنیادی گفته می‌شود و جایگاه‌های اصلی آن‌ها، مغز استخوان، قلب، کلیه‌ها، پوست، کبد، لوزالمعده، تخمدان‌ها، بند ناف، جفت و مایع آمنیوتیک می‌باشد. سلول‌های بنیادی خون‌ساز مغز استخوان (HSCها) اولین ASCهایی بودند که بر روی آن‌ها مطالعه انجام شد و نتیجتاً به بهترین نحو شناسایی شدند. این سلول‌ها قابلیت تمایز به رده‌های لنفوییدی و میلویدی خون را دارند و عمل پیوند آن‌ها مدت زمان زیادی است که جهت درمان سرطان و بیماری‌های مغز استخوان استفاده می‌گردد.

نوع دیگری از ASCها که در مغز استخوان حضور دارند و از لحاظ صفات از HSCها متمایز هستند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) می‌باشند که با عنوان سلول‌های بنیادی استرومایی نیز شناخته می‌شوند. از آنجایی که MSCها از تکثیر و فعل و انفعالات سمیت‌زای سلول‌های ایمنی جلوگیری به عمل می‌آورند، در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله فرم حاد بیماری پیوند علیه میزبان^{۶۱} GVHD به کار گرفته می‌شوند. استفاده از MSCها در درمان این بیماری یک گزینه بسیار امیدوارکننده بوده و به صورت تزریق MSCهای مغز استخوان یک دهنده ثالث^{۶۲} صورت می‌پذیرد. اولین آزمایش بالینی از سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی نیز به سال ۱۹۹۵ برمی‌گردد که ۱۵ بیمار از تزریق MSCهای مشتق از مغز استخوان بهره‌مند شدند (۱۷۵).

در راستای اهداف آتی تحقیق، تبیین اهمیت بسیار زیاد ریزمحیط تومور در توسعه سرطان ضروری خواهد بود. در باب اهمیت ریزمحیط لوسمی، مهم است که مکانیسم‌های فیزیولوژیک

^{۶۱} Graft-versus-host disease

^{۶۲} Third-party donor

نرمالی را که به واسطه آنها، آشیانه مغز استخوان از HSCها حمایت می‌کند شناسایی کنیم. HSCها در مناطق تخصص‌یافته‌ای از ریزمحیط مغز استخوان مستقر هستند که در قالب دو نوع آشیانه متمایز آنها را می‌شناسیم: استئوبلاستیک (اندوستیال) و عروقی یا آوندی^{۶۳}. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که این دو آشیانه، هماهنگ و به موازات هم فعالیت می‌کنند. Xie و همکاران ثابت کردند که اندوستیوم، منطقه‌ای مملو از عروق را در نزدیکی سلول‌های پیش‌استخوانی ایجاد می‌کند و به این ترتیب باعث افزایش هر چه بیشتر HSCها در پاسخ به آسیب مغز استخوان می‌گردد. همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، رشد و نمو سلول‌های خون‌ساز، توسط سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) و از طریق تولید سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و پیام‌رسان‌های داخل سلولی تنظیم می‌گردد. BMSCها، سلول‌های مختلف مانند استئوبلاست‌ها، استئوکلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های رتیکولار پیش‌استخوانی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را شامل می‌شوند که هر کدام از آنها به نوبه خود برای تنظیم پایداری و استقرار HSCها اهمیت حیاتی دارند. همچنین اهمیت ریزمحیط هماتوپویتیک در شکل‌گیری بیماری در مطالعاتی که روی موش دارای نقص در همولوگ فسفاتاز و تنسین (PTEN) انجام گرفت، مشخص شد. نقص PTEN هم در سلول‌های هماتوپویتیک و هم در ریزمحیط منجر به شکل‌گیری لوسمی لنفوم شد. اما حذف القاشده در ژن PTEN در سلول‌های خون‌ساز، در حضور یک ریزمحیط طبیعی موجب کاهش HSCها بدون شواهدی مبنی بر گسترش لوسمی و یا تکثیر سلول‌های میلوئیدی شد که این نشان از اهمیت بسیار زیاد ریزمحیط در مراحل مختلف سرطان داشت و نشان می‌داد که نقص PTEN به تنهایی برای ایجاد بدخیمی، کافی نخواهد بود. به هر حال باید مجدداً به اهمیت اثرات

متقابل سلول‌های هماتوپویتیک و آشیانه/ریز محیط مغز استخوان اشاره نمود و بیان کرد هر عاملی که بتواند این ریز محیط را از حالت نرمال خارج کند می‌تواند بر روی خونسازی تغییر ایجاد کرده و متعاقباً منجر به بدخیمی‌های خونی مانند لوسمی گردد (۱۷۶).

۵-۲ نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه میزان فراگیری گسترده پاروویروس B19، چه بسا این ویروس در بسیاری از افراد، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را که مهم‌ترین اجزای آشیانه مغز استخوان و حمایت‌کننده سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCها) هستند آلوده کرده، برای سالیان متمادی نهفته باقی مانده و به مرور با القای ترشح سایتوکاین‌های التهابی و واسطه‌های شیمیایی و ایجاد التهاب مزمن در ریز محیط مغز استخوان، پایه‌گذار سرطان‌ها و بیماری‌های خونی مرتبط گردد؛

۵-۳ پیشنهادات

بنابراین نتایج این مطالعه برای اولین بار علاوه بر این که اهمیت عفونت با B19V را در ایجاد فضای التهابی مغز استخوان بیان می‌کند، ارتباط این ویروس را نیز با ایجاد بدخیمی‌های ارگان‌های خون‌ساز پیشنهاد می‌دهد. جهت تکمیل این موضوع پیشنهاد می‌گردد در مطالعات آتی اثر فاکتورهای ضد التهابی نظیر IL10 نیز مورد ارزیابی قرار گیرد تا نتایج جامع‌تری حاصل گردد. اگرچه همان‌طور که اشاره شد قطعاً مطالعات ملکولی بیشتری در این زمینه نیاز است، بر اساس یافته‌های این تحقیق، سنجش‌های ملکولی قبل از هر اقدام درمانی با سلول‌های بنیادی، جهت تشخیص آلودگی با پاروویروس B19 به طور اکید توصیه می‌گردد.

فهرست منابع

References

1. Virchow R. Die Krankhaften Geschwulste August Hirschwald. Berlin, Germany. 1863.
2. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
3. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of immunology research*. 2014;2014.
4. Taniguchi K, Karin M, editors. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in immunology*; 2014: Elsevier.
5. Li Y, Wang L, Pappan L, Galliher-Beckley A, Shi J. IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. *Molecular cancer*. 2012;11(1):87.
6. Michaud DS, Daugherty SE, Berndt SI, Platz EA, Yeager M, Crawford ED, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1B (IL-1B), IL-6, IL-8, and IL-10 and risk of prostate cancer. *Cancer research*. 2006;66(8):4525-30.
7. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor α and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*. 2005;26(3):631-6.
8. Pal S, Bhattacharjee A, Ali A, Mandal NC, Mandal SC, Pal M. Chronic inflammation and cancer: potential chemoprevention through nuclear factor kappa B and p53 mutual antagonism. *Journal of inflammation*. 2014;11(1):23.
9. Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015;12(10):584-96.
10. Wang K, Karin M. Chapter Five-Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Advances in cancer research*. 2015;128:173-96.
11. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(9):745.
12. Balkwill F. TNF- α in promotion and progression of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006;25(3):409-16.
13. de Martel C, Franceschi S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2009;70(3):183-94.
14. Giam C-Z, Jeang K-T. HTLV-1 Tax and adult T-cell leukemia. *Front Biosci*. 2007;12(4):1.
15. zur Hausen H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers. *Infections causing human cancer*. 2006:145-243.

16. zur Hausen H, editor *Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes*. Seminars in cancer biology; 1999: Elsevier.
17. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*. 2004;78(21):11451-60.
18. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
19. Nicholas J. Human herpesvirus 8-encoded proteins with potential roles in virus-associated neoplasia. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2007;12:265-81.
20. Cathomas G. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)/human herpesvirus 8 (HHV-8) as a tumour virus. *HERPES-CAMBRIDGE*. 2003;10(3):72-7.
21. Pagano JS. Epstein-Barr Virus: The First Human Tumor Virus and its Role in Cancer. *Proceedings of the Association of American Physicians*. 1999;111(6):573-80.
22. Tao Q, Young LS, Woodman C, Murray PG. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers—genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci*. 2006;11(2):2672-713.
23. Klein E, Kis L, Klein G. Epstein-Barr virus infection in humans: from harmless to life endangering virus-lymphocyte interactions. *Oncogene*. 2007;26(9):1297.
24. Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: paradigms for viral-related human carcinogenesis. *Oncogene*. 2006;25(27):3823.
25. Lee A, Lee C. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma—the etiopathogenic link. *Front Biosci*. 2007;12(1):234-45.
26. Fritch Lilla SA, Burgett SE, McGann KA, Wechsler DS. Persistent and prolonged parvovirus B19 viremia in a pediatric patient with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2014;4(3):e38-e40.
27. Vasconcelos GM, Christensen BC, Houseman EA, Xiao J, Marsit CJ, Wiencke JK, et al. History of parvovirus B19 infection is associated with a DNA methylation signature in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. 2011;6(12):1436-43.
28. Ibrahim WN, Hasony HJ, Hassan JG. Human parvovirus B19 in childhood acute lymphoblastic leukaemia in Basrah. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2014;64(1):9-12.
29. Jitschin R, Peters O, Plentz A, Turowski P, Segerer H, Modrow S. Impact of parvovirus B19 infection on paediatric patients with haematological and/or oncological disorders. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(9):1336-42.
30. Ablal O, Gassas A, Stevens R, Grant R, Abdelhaleem M. bcr-abl-positive T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with parvovirus B19 infection. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2006;28(2):98-9.

31. Yetgin S, Çetin M, Aslan D, Öyürek E, Anlar B, Uçkan D. Parvovirus B19 infection presenting as pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia: a transient and progressive course in two children. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2004;26(10):689-92.
32. Yetgin S, Çetin M, Yenicesu İ, Özaltın F, Uçkan D. Acute parvovirus B19 infection mimicking juvenile myelomonocytic leukemia. *European journal of haematology*. 2000;65(4):276-8.
33. Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends in microbiology*. 2005;13(6):278-84.
34. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annual Reviews in Microbiology*. 1999;53(1):577-628.
35. Barozzi P, Potenza L, Riva G, Vallerini D, Quadrelli C, Bosco R, et al. B cells and herpesviruses: a model of lymphoproliferation. *Autoimmunity reviews*. 2007;7(2):132-6.
36. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260-5.
37. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. Elsevier; 2009.
38. Javier RT, Butel JS. The history of tumor virology. *Cancer research*. 2008;68(19):7693-706.
39. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, et al. The dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human cancer. *Genome research*. 2009;19(3):438-51.
40. Tolfvenstam T, Broliden K, editors. Parvovirus B19 infection. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*; 2009: Elsevier.
41. Luo Y, Qiu J. Human parvovirus B19: a mechanistic overview of infection and DNA replication. *Future virology*. 2015;10(2):155-67.
42. Rogo L, Mokhtari-Azad T, Kabir M, Rezaei F. Human parvovirus B19: a review. *Acta Virol*. 2014;58(3):199-213.
43. Courouce A, Ferchal F, Muller A, Soulier J, Morinet F, Drouet J, et al. Human parvovirus infections in France. *The Lancet*. 1984;323(8369):160.
44. Okochi K, Mori R, Miyazaki M, Cohen B, Mortimer P, Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *The Lancet*. 1984;323(8369):160-1.
45. Shiraishi H, Wong D, Purcell R, Shirachi R, Kumasaka E, Numazaki Y. Antibody to human parvovirus in outbreak of erythema infectiosum in Japan. *The Lancet*. 1985;325(8435):982-3.
46. Anderson M, Jones S, Fisher-Hoch S, Lewis E, Hall S, Bartlett C, et al. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *The Lancet*. 1983;321(8338):1378.
47. Gallinella G. Parvovirus B19 achievements and challenges. *ISRN Virology*. 2013;2013.
48. Pringle C. Virus taxonomy at the XIth international congress of virology, Sydney, Australia, 1999. *Archives of virology*. 1999;144(10):2065-70.
49. Li Y, Dong Y, Jiang J, Yang Y, Liu K, Li Y. High prevalence of human parvovirus infection in patients with malignant tumors. *Oncology letters*. 2012;3(3):635-40.

50. Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(6):586-97.
51. Brown K, Anderson L, Young N. Human Parvovirus B19: Monographs in Virology. *Human Parvovirus B19: Monographs in Virology*. 1997;20.
52. Lukashov VV, Goudsmit J. Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. *Journal of virology*. 2001;75(6):2729-40.
53. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *Journal of virology*. 2002;76(18):9124-34.
54. Hokynar K, Söderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, et al. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology*. 2002;302(2):224-8.
55. Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, Brown KE. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology*. 2002;301(2):374-80.
56. Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-Chenon A. Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia. *The Lancet*. 1998;352(9139):1524.
57. Kühl U, Lassner D, Pauschinger M, Gross U, Seeberg B, Noutsias M, et al. Prevalence of erythrovirus genotypes in the myocardium of patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of medical virology*. 2008;80(7):1243-51.
58. Wong S, Young NS, Brown KE. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(10):1581-6.
59. Sanabani S, Neto WK, Pereira J, Sabino EC. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(2):604-6.
60. Norja P, Hokynar K, Aaltonen L-M, Chen R, Ranki A, Partio EK, et al. Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(19):7450-3.
61. Candotti D, Etiz N, Parsyan A, Allain J-P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *Journal of virology*. 2004;78(22):12169-78.
62. Hübschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, et al. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(11):3735-8.
63. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, et al. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. 1991;1456-64.

64. Summers J, Jones S, Anderson M. Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *Journal of General Virology*. 1983;64(11):2527-32.
65. Clewley J. Biochemical characterization of a human parvovirus. *Journal of General Virology*. 1984;65(1):241-5.
66. Cotmore SF, Tattersall P. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science*. 1984;226:1161-6.
67. Deiss V, Tratschin J-D, Weitz M, Siegl G. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology*. 1990;175(1):247-54.
68. Zuccheri G, Bergia A, Gallinella G, Musiani M, Samorì B. Scanning Force Microscopy Study on a Single-Stranded DNA: The Genome of Parvovirus B19. *Chembiochem*. 2001;2(3):199-204.
69. Zádori Z, Szelei J, Lacoste M-C, Li Y, Gariépy S, Raymond P, et al. A viral phospholipase A 2 is required for parvovirus infectivity. *Developmental cell*. 2001;1(2):291-302.
70. Shade R, Blundell M, Cotmore S, Tattersall P, Astell CR. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *Journal of virology*. 1986;58(3):921-36.
71. Guan W, Cheng F, Yoto Y, Kleiboeker S, Wong S, Zhi N, et al. Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. *Journal of virology*. 2008;82(20):9951-63.
72. Chen Z, Guan W, Cheng F, Chen AY, Qiu J. Molecular characterization of human parvovirus B19 genotypes 2 and 3. *Virology*. 2009;394(2):276-85.
73. Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall P. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *Journal of virology*. 1986;60(2):548-57.
74. Luo W, Astell CR. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology*. 1993;195(2):448-55.
75. Ozawa K, Young N. Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. *Journal of virology*. 1987;61(8):2627-30.
76. Amand JS, Astell CR. Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology*. 1993;192(1):121-31.
77. Pillet S, Morinet F. Parvovirus B19 and erythroid cells. *Pathologie Biologie*. 2002;50(5):349-56.
78. Tattersall P, Ward DC. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature*. 1976;263(5573):106-9.
79. Wolter S, Richards R, Armentrout R. Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*. 1980;607(3):420-31.
80. Durham P, Johnson R. Studies on the replication of a bovine parvovirus. *Veterinary microbiology*. 1985;10(2):165-77.

81. Pritchard C, Stout E, Bates RC. Replication of parvoviral DNA. I. Characterization of a nuclear lysate system. *Journal of virology*. 1981;37(1):352-62.
82. Kollek R, Goulian M. Synthesis of parvovirus H-1 replicative form from viral DNA by DNA polymerase gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(10):6206-10.
83. Robertson AT, Bates RC, Stout ER. Purified DNA polymerase γ replicates bovine parvovirus DNA to a unit-length product. *Biochemical and biophysical research communications*. 1983;117(2):580-6.
84. Christensen J, Cotmore SF, Tattersall P. Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *Journal of virology*. 1997;71(8):5733-41.
85. Luo Y, Lou S, Deng X, Liu Z, Li Y, Kleiboeker S, et al. Parvovirus B19 infection of human primary erythroid progenitor cells triggers ATR-Chk1 signaling, which promotes B19 virus replication. *Journal of virology*. 2011;85(16):8046-55.
86. Costello E, Sahli R, Hirt B, Beard P. The mismatched nucleotides in the 5'-terminal hairpin of minute virus of mice are required for efficient viral DNA replication. *Journal of virology*. 1995;69(12):7489-96.
87. Cotmore S, Tattersall P. The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *Journal of virology*. 1988;62(3):851-60.
88. Tam P, Astell CR. Replication of minute virus of mice minigenomes: novel replication elements required for MVM DNA replication. *Virology*. 1993;193(2):812-24.
89. Cotmore S, Tattersall P. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *Journal of virology*. 1989;63(9):3902-11.
90. Christensen J, Pedersen M, Aasted B, Alexandersen S. Purification and characterization of the major nonstructural protein (NS-1) of Aleutian mink disease parvovirus. *Journal of virology*. 1995;69(3):1802-9.
91. Chejanovsky N, Carter BJ. Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates a dominant negative phenotype for DNA replication. *Journal of virology*. 1990;64(4):1764-70.
92. Cotmore SF, Tattersall P. Resolution of parvovirus dimer junctions proceeds through a novel heterocruciform intermediate. *Journal of virology*. 2003;77(11):6245-54.
93. Doerig C, Beard P, Hirt B. A transcriptional promoter of the human parvovirus 1319 Active in vitro and in vivo. *Virology*. 1987;157(2):539-42.
94. Gareus R, Gigler A, Hemauer A, Leruez-Ville M, Morinet F, Wolf H, et al. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *Journal of virology*. 1998;72(1):609-16.
95. Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller H-H, Doyle S, Modrow S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology*. 2002;293(1):86-93.

96. Sol N, Morinet F, Alizon M, Hazan U. Trans-activation of the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1 by the parvovirus B19 NS1 gene product. *Journal of General Virology*. 1993;74(9):2011-4.
97. Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, et al. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *Journal of virology*. 1996;70(12):8485-91.
98. Nüesch JP, Corbau R, Tattersall P, Rommelaere J. Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated in vitro by the phosphorylation state of the polypeptide. *Journal of virology*. 1998;72(10):8002-12.
99. Nüesch JP, Lachmann S, Corbau R, Rommelaere J. Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKC λ in vivo. *Journal of virology*. 2003;77(1):433-42.
100. Pujol A, Deleu L, Nüesch J, Cziepluch C, Jauniaux J-C, Rommelaere J. Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *Journal of virology*. 1997;71(10):7393-403.
101. Christensen J, Cotmore SF, Tattersall P. Minute virus of mice initiator protein NS1 and a host KDWK family transcription factor must form a precise ternary complex with origin DNA for nicking to occur. *Journal of virology*. 2001;75(15):7009-17.
102. Rosenfeld S, Yoshimoto K, Kajigaya S, Anderson S, Young N, Field A, et al. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;89(6):2023.
103. Dorsch S, Liebisch G, Kaufmann B, von Landenberg P, Hoffmann JH, Drobnik W, et al. The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. *Journal of virology*. 2002;76(4):2014-8.
104. Brown K, Cohen B. Haemagglutination by parvovirus B19. *Journal of general virology*. 1992;73(8):2147-9.
105. Brown KE, Hibbs JR, Gallinella G, Anderson SM, Lehman ED, McCarthy P, et al. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *New England Journal of Medicine*. 1994;330(17):1192-6.
106. Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(5):1198-205.
107. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science*. 1986;233:883-7.
108. Ozawa K, Kurtzman G, Young N. Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood*. 1987;70(2):384-91.
109. Srivastava A, Lu L. Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. *Journal of virology*. 1988;62(8):3059-63.
110. Munshi N, Zhou S, Woody M, Morgan D, Srivastava A. Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *Journal of virology*. 1993;67(1):562-6.

111. Flunker G, Peters A, Wiersbitzky S, Modrow S, Seidel W. Persistent parvovirus B19 infections in immunocompromised children. *Medical microbiology and immunology*. 1998;186(4):189-94.
112. Lundqvist A, Tolfvenstam T, Bostic J, Söderlund M, Broliden K. Clinical and laboratory findings in immunocompetent patients with persistent parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 1999;31(1):11-6.
113. Woolf AD, Campion GV, Chishick A, Wise S, Cohen BJ, Klouda PT, et al. Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. *Archives of Internal Medicine*. 1989;149(5):1153-6.
114. Sheikh AU, Ernest JM. Clinical picture and consequences of fetal parvovirus B19 infection. Taylor & Francis; 1995.
115. Servant-Delmas A, Lefrère J-J, Morinet F, Pillet S. Advances in human B19 erythrovirus biology. *Journal of virology*. 2010;84(19):9658-65.
116. Heegaard ED, Brown KE. Human parvovirus B19. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(3):485-505.
117. Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood*. 2010;116(15):e41-e55.
118. Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA, Rodriguez BR, Klier SA, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Molecular pharmacology*. 1996;50(5):1087-94.
119. Friedenstein A, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova K. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*. 1966;16(3):381-90.
120. Terhes G, Jenei M, Bereg E, Túri S, Deák J. Neurologic consequence of a parvovirus B19 infection. *Journal of Clinical Virology*. 2013;56(2):156-8.
121. Le Y, Fraineau S, Chandran P, Sabloff M, Brand M, Lavoie JR, et al. Adipogenic mesenchymal stromal cells from bone marrow and their hematopoietic supportive role: towards understanding the permissive marrow microenvironment in acute myeloid leukemia. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2016;12(2):235-44.
122. Huang J, Basu S, Zhao X, Chien S, Fang M, Oehler V, et al. Mesenchymal stromal cells derived from acute myeloid leukemia bone marrow exhibit aberrant cytogenetics and cytokine elaboration. *Blood cancer journal*. 2015;5(4):e302.
123. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *International orthopaedics*. 2015;39(4):807-17.
124. Baker N, Boyette LB, Tuan RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*. 2015;70:37-47.
125. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Ferreira TG, Kao WW. Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC ophthalmology*. 2015;15(1):155.
126. Tian J, Rui K, Tang X, Wang W, Ma J, Tian X, et al. IL-17 down-regulates the immunosuppressive capacity of olfactory ecto-mesenchymal stem cells in murine collagen-induced arthritis. *Oncotarget*. 2016;7(28):42953.

127. Chen Q, Yuan Y, Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Molecular medicine reports*. 2014;9(1):293-8.
128. Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World journal of stem cells*. 2015;7(2):470.
129. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
130. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*. 1998;282(5391):1145-7.
131. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991;9(5):641-50.
132. Bianco P. Stem cells and bone: a historical perspective. *Bone*. 2015;70:2-9.
133. Murray IR, Péault B. Q&A: Mesenchymal stem cells—where do they come from and is it important? *BMC biology*. 2015;13(1):99.
134. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*. 2008;2(4):313-9.
135. Tamadon A, Mehrabani D, Zarezadeh Y, Rahmanifar F, Dianatpour M, Zare S. Caprine Endometrial Mesenchymal Stromal Stem Cell: Multilineage Potential, Characterization, and Growth Kinetics in Breeding and Anestrous Stages. *Veterinary medicine international*. 2017;2017.
136. Bentivegna A, Roversi G, Riva G, Paoletta L, Redaelli S, Miloso M, et al. The effect of culture on human bone marrow mesenchymal stem cells: focus on DNA methylation profiles. *Stem cells international*. 2016;2016.
137. Hoffmann A, Floerkemeier T, Melzer C, Hass R. Comparison of in vitro-cultivation of human mesenchymal stroma/stem cells derived from bone marrow and umbilical cord. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016.
138. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem cells*. 2003;21(5):527-35.
139. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nature protocols*. 2009;4(1):102.
140. Gottipamula S, Muttigi MS, Chaansa S, Ashwin K, Priya N, Kolkundkar U, et al. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016;10(2):108-19.
141. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem cells and development*. 2004;13(4):436-48.
142. Murray IR, West CC, Hardy WR, James AW, Park TS, Nguyen A, et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(8):1353-74.

143. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Development, growth & differentiation*. 2006;48(6):361-70.
144. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry Part A*. 2013;83(1):48-61.
145. Muñoz C, Teodosio C, Mayado A, Amaral AT, Matarraz S, Bárcena P, et al. Ex vivo identification and characterization of a population of CD13 high CD105+ CD45- mesenchymal stem cells in human bone marrow. *Stem cell research & therapy*. 2015;6(1):169.
146. Pourgholaminejad A, Aghdami N, Baharvand H, Moazzeni SM. The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells. *Cytokine*. 2016;85:51-60.
147. Mukonoweshuro B, Brown CJ, Fisher J, Ingham E. Immunogenicity of undifferentiated and differentiated allogeneic mouse mesenchymal stem cells. *Journal of tissue engineering*. 2014;5:2041731414534255.
148. Chang Y, Hsieh P-H, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Med J*. 2009;32(3):264-75.
149. Lin S-S, Zhu B, Guo Z-K, Huang G-Z, Wang Z, Chen J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect rat pheochromocytoma PC12 cells from glutamate-induced injury via a PI3K/Akt dependent pathway. *Neurochemical research*. 2014;39(5):922-31.
150. Xie L, Mao M, Zhou L, Jiang B. Spheroid mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cell-derived microvesicles: two potential therapeutic strategies. *Stem cells and development*. 2015;25(3):203-13.
151. Xie H, Sun L, Zhang L, Liu T, Chen L, Zhao A, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Support Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived CD34. *Stem cells international*. 2016;2016.
152. Monsel A, Zhu Y-g, Gennai S, Hao Q, Hu S, Rouby J-J, et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell-derived microvesicles in severe pneumonia in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;192(3):324-36.
153. Adamson-Small LA, Ignatovich IV, Laemmerhirt MG, Hobbs JA. Persistent parvovirus B19 infection in non-erythroid tissues: possible role in the inflammatory and disease process. *Virus research*. 2014;190:8-16.
154. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2009;31(1):37-49.
155. Fan Y, Mao R, Yang J. NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein & cell*. 2013;4(3):176-85.
156. Shigdar S, Li Y, Bhattacharya S, O'Connor M, Pu C, Lin J, et al. Inflammation and cancer stem cells. *Cancer letters*. 2014;345(2):271-8.

157. Wu Y, Antony S, Meitzler JL, Doroshow JH. Molecular mechanisms underlying chronic inflammation-associated cancers. *Cancer letters*. 2014;345(2):164-73.
158. Coussens LM, Zitvogel L, Palucka AK. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? *Science*. 2013;339(6117):286-91.
159. Waldner MJ, Neurath MF, editors. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Seminars in immunology*; 2014: Elsevier.
160. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006;124(4):823-35.
161. Cassinotti P, Burtonboy G, Fopp M, Siegl G. Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *Journal of medical virology*. 1997;53(3):229-32.
162. Sundin M, Lindblom A, Örvell C, Barrett AJ, Sundberg B, Watz E, et al. Persistence of human parvovirus B19 in multipotent mesenchymal stromal cells expressing the erythrocyte P antigen: implications for transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2008;14(10):1172-9.
163. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature reviews Cancer*. 2013;13(11):759.
164. Corrêa GTB, Bandeira GA, Cavalcanti BG, de Carvalho Fraga CA, dos Santos EP, Silva TF, et al. Association of -308 TNF- α promoter polymorphism with clinical aggressiveness in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2011;47(9):888-94.
165. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, Nakagawa M, Kumano K, Arai S, et al. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(2):528.
166. Sakuma S, Sawamura Y, Tada M, Aida T, Abe H, Suzuki K, et al. Responses of human glioblastoma cells to human natural tumor necrosis factor- α : Susceptibility, mechanism of resistance and cytokine production studies. *Journal of neuro-oncology*. 1993;15(3):197-208.
167. Zhai K, Ding J, Zhou Y. Different role of tumor necrosis factor- α polymorphism in non-Hodgkin lymphomas among Caucasian and Asian populations: a meta-analysis. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(5):7684-98.
168. Gilmore TD. The Rel/NF- κ B/I κ B signal transduction pathway and cancer. *Signal Transduction in Cancer*: Springer; 2004. p. 241-65.
169. Alberti C, Pinciroli P, Valeri B, Ferri R, Ditto A, Umezawa K, et al. Ligand-dependent EGFR activation induces the co-expression of IL-6 and PAI-1 via the NF κ B pathway in advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Oncogene*. 2012;31(37):4139.
170. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells. *Journal of carcinogenesis*. 2011;10.
171. [Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4455122/?report=reader>.

172. Rao S, Sengupta R, Choe EJ, Woerner BM, Jackson E, Sun T, et al. CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma. *PloS one*. 2012;7(3):e33005.
173. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. *Nature*. 2011;474(7351):318.
174. Molenaar-de Backer MW, de Waal M, Sjerps MC, Koppelman MH. Validation of new real-time polymerase chain reaction assays for detection of hepatitis A virus RNA and parvovirus B19 DNA. *Transfusion*. 2016;56(2):440-8.
175. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, Pezzi A, Laureano AM, da Silva MAL, et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human cell*. 2014;27(4):137-50.
176. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *Journal of clinical oncology*. 2011;29(5):591-9.

Abstract:

Background: Chronic inflammation as demonstrated by much scientific evidence plays a prominent role in cancer initiation and development. On the other hand, the Inflammation can be established by a number of factors such as viral infections. Parvovirus B19 (B19V) is a pathogen with widespread infection, which infects bone marrow erythroid progenitor cells. It has shown that B19V could enter human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) but its infection is latent. In this study, we hypothesized that hBM-MSCs as the main cellular component of bone marrow niche may be induced to secrete pro-inflammatory cytokines after B19V infection.

Material and methods: hBM-MSCs were cultured up to passage 3 in standard culture medium. The cells were then subjected to nucleofection to transfer a plasmid containing B19V genome. After 36h, total RNA was extracted from all of studied groups and the expression levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α and NF- κ B genes were examined using qRT-PCR.

Results: Analysis of obtained data from qRT-PCR showed the significant increase in gene expression of all four studied genes (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and NF- κ B) in the cells which were transfected with B19V (P<0.05).

Conclusion: Until today, several researchers have demonstrated persistence of B19V in different tissues, especially bone marrow. Although further researches are required, our findings for the first time suggest the importance of B19V infection of hBM-MSCs to establish an inflammatory microenvironment in the

bone marrow and its involvement in inflammation-related diseases of hematopoietic organ. Finally, based on our results, molecular assay to diagnose B19V infection of hBM-MSCs prior to stem cell therapy is strongly recommended.

Keywords: bone marrow, chronic inflammation, infection, mesenchymal stem cell, parvovirus B19